# VERGÄRUNG VON FUMARAT UND L-MALAT DURCH CLOSTRIDIUM FORMICOACETICUM

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Mechthild Dorn
aus Jena

Göttingen 1976

# VERGÄRUNG VON FUMARAT UND L-MALAT DURCH CLOSTRIDIUM FORMICOACETICUM

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Mechthild Dorn
aus Jena

Göttingen 1976

Diese Arbeit wurde im Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen durchgeführt.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Prof. Dr. G. Gottschalk
Korreferent: Prof. Dr. H.G. Schlegel

Tag der mündlichen Prüfung: 1.7.1976

ABKÜRZUNGEN

| | |
|---|---|
| a | Variable für Fumarat bzw. L-Malat in den Gärgleichungen |
| ADP | Adenosin-diphosphat |
| AMP | Adenosin-monophosphat |
| APAD | Acetylpyridin-adenindinukleotid |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| ATP | Adenosin-triphosphat |
| ATPase | Adenosin-triphosphatase |
| b | Variable für Formiat in den Gärgleichungen |
| BV | Benzylviologen |
| C. | Clostridium |
| CCCP | Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon |
| Ci | Curie |
| CoASH | Coenzym A |
| DCCD | Dicyclohexyl-carbodiimid |
| DCPIP | Dichlorphenolindophenol |
| DEA | Diäthanolamin |
| -DH | Dehydrogenase |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| DNP | 2,4-Dinitrophenol |
| DSM | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen |
| DTE | Dithioerythrit |
| E | Enzymeinheit |
| EC | Enzyme Collection |
| EDTA | Äthylendiamintetraessigsäure |
| Fa. | Firma |
| FAD | Flavin-adenin-dinukleotid |
| Fd | Ferredoxin |
| FMN | Flavin-mononukleotid |
| GDP | Guanosin-diphosphat |
| GTP | Guanosin-triphosphat |
| HEPES | N-2'-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthan-sulfonsäure |
| LDH | Lactat-Dehydrogenase |
| $\mu$ | Wachstumsrate |
| MDH | Malat-Dehydrogenase |
| MET | Mercaptoäthanol |
| MV | Methylviologen |

| | |
|---|---|
| $NAD(H_2)$ | Nicotinamid-adenin-dinukleotid (reduziert) |
| $NADP(H_2)$ | Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (reduziert) |
| OD | Optische Dichte |
| -P | Phosphat |
| PEP | Phosphoenolpyruvat |
| PMS | Phenazinmethosulfat |
| PP | Pyrophosphat |
| Std. | Stunde(n) |
| $t_d$ | Verdopplungszeit |
| TEA | Triäthanolamin |
| TG | Trockengewicht |
| THF | Tetrahydrofolsäure |
| Tris | Tris-hydroxymethyl-aminomethan |
| TTC | 2,3,5-Triphenyl-tetrazoliumchlorid |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| x | Variable für Succinat in den Gärgleichungen |
| $Y_m$ | Molarer Ertragskoeffizient |
| $Y_{ATP}$ | Energieertragskoeffizient |

INHALTSVERZEICHNIS


| | | Seite |
|---|---|---|
| I. | EINLEITUNG | 1 |
| II. | EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE | 4 |
| | 1. Wachstumsversuche mit Clostridium formicoaceticum | 4 |
| 1.1. | Wachstum auf Fumarat | 4 |
| 1.1.1. | Optimierung der Wachstumsbedingungen | 4 |
| 1.1.1.1. | Bestimmung der optimalen Fumaratkonzentration | 4 |
| 1.1.1.2. | Bestimmung der optimalen Bicarbonat- und Formiatkonzentrationen | 6 |
| 1.1.1.3. | Bestimmung des optimalen pH-Wertes für das Wachstum auf Fumarat | 9 |
| 1.1.2. | Wachstumsversuche | 10 |
| 1.1.2.1. | Wachstum auf Fumarat in Abwesenheit von Bicarbonat und Formiat | 10 |
| 1.1.2.2. | Wachstum auf Fumarat in Gegenwart von Bicarbonat | 16 |
| 1.1.2.3. | Wachstum auf Fumarat in Gegenwart von Formiat | 18 |
| 1.2. | Wachstum auf L-Malat | 20 |
| 1.2.1. | Optimierung der Wachstumsbedingungen | 21 |
| 1.2.1.1. | Bestimmung der optimalen Bicarbonat- und Formiatkonzentrationen | 21 |
| 1.2.1.2. | Bestimmung des optimalen pH-Wertes für das Wachstum auf L-Malat | 23 |
| 1.2.2. | Wachstumsversuche | 25 |
| 1.2.2.1. | Wachstum auf L-Malat in Abwesenheit von Bicarbonat und Formiat | 25 |
| 1.2.2.2. | Wachstum auf L-Malat in Gegenwart von Bicarbonat | 28 |
| 1.2.2.3. | Wachstum auf L-Malat in Gegenwart von Formiat | 29 |
| 1.3. | Zusammenfassung der Wachstumsversuche mit Fumarat und L-Malat | 31 |

Seite

1.4. Wachstum von C. formicoaceticum auf Fumarat in Kombination mit anderen Substraten 36
1.4.1. Wachstum von C. formicoaceticum auf Fumarat und Lactat 36
1.4.2. Wachstum auf Fumarat und Fructose 37

2. Gärversuche mit ruhenden Zellen 41

2.1. Vergärung von Fumarat 41
2.1.1. Gärversuch mit 1,4-$^{14}$C-Fumarat 43
2.1.2. Vergärung von Fumarat durch ruhende Zellen in Gegenwart von Bicarbonat oder Formiat 45
2.2. Vergärung von L-Malat durch ruhende Zellen 47
2.2.1. Vergärung von L-Malat ohne Bicarbonatzusatz sowie in Gegenwart von Bicarbonat oder Formiat 48
2.3. Vergärung von Fumarat durch ruhende Zellen nach Anzucht auf Fructose 49
2.4. Aufstellung einer allgemeinen Gärgleichung 51
2.4.1. Allgemeine Gleichung für die Vergärung von Fumarat 51
2.4.2. Allgemeine Gleichung für die Vergärung von L-Malat 53
2.5. Zusammenfassung der Gärversuche mit ruhenden Zellen 55

3. Nachweis der am $C_4$-Dicarbonsäure-Stoffwechsel beteiligten Enzyme in Rohextrakten 59

3.1. Fumarat-Reduktase 59
3.1.1. Optimierung der Testbedingungen 59
3.1.2. Vergleich der Fumarat-Reduktase-Aktivitäten in Rohextrakten nach verschiedenen Zellaufschlußverfahren 62
3.1.3. Stabilität der Fumarat-Reduktase-Aktivität mit reduziertem MV als Elektronendonator 65
3.1.4. Aktivität der Fumarat-Reduktase in Zellen nach Anzucht auf verschiedenen Substraten 66

Seite

3.1.5. Fumarat-Reduktase-Aktivität mit $NADH_2$, Formiat und Pyruvat als Elektronendonatoren 69
3.1.5.1. $NADH_2$ als Elektronendonator 70
3.1.5.2. Formiat als Elektronendonator 72
3.1.5.3. Pyruvat als Elektronendonator 72
3.1.6. Versuche zum Nachweis einer Succinat-Dehydrogenase-Aktivität 74
3.2. Fumarase 74
3.3. Malat-Enzym 75
3.4. Acetat-Kinase 77
3.5. Formiat-Dehydrogenase 79
3.6. Verteilung von Fumarat-Reduktase, Malat-Enzym und Acetat-Kinase in den Extraktfraktionen nach Lysozymaufschluß bzw. osmotischem Schock ganzer Zellen 79

4. Versuche zum Nachweis einer ATPase-Aktivität in Zellen von C.formicoaceticum 88

5. Nachweis einer alkalischen Phosphatase-Aktivität in Extrakten von C.formicoaceticum 89

6. Nachweis eines Cytochroms in Zellen von C.formicoaceticum 90
6.1. Redox-Differenzspektren bei Raumtemperatur und bei -196 °C 91
6.2. Pyridin-Hämochrom-Spektren 93
6.3. Kohlenmonoxid-Spektren 94
6.4. Aceton-HCl-Extraktion der Hämgruppe 96
6.5. Bestimmung des Cytochromgehaltes in Partikelfraktionen 97
6.6. Nachweis eines Cytochroms in Clostridium thermoaceticum 98

7. Nachweis von Menachinon in C.formicoaceticum und C.thermoaceticum 99

Seite

III. DISKUSSION 100

IV. ZUSAMMENFASSUNG 135

V. MATERIAL UND METHODEN 139

VI. LITERATURVERZEICHNIS 171

# I. EINLEITUNG

Fumarat und L-Malat kommen in größeren Mengen in verschiedenen Pflanzen vor. Fumarat wird vom Erdrauch (Fumaria) und von Basidiomyceten gebildet, L-Malat ist in höherer Konzentration in zahlreichen Früchten enthalten. Da beide Säuren Intermediärprodukte des Tricarbonsäure-Zyklus sind, ist leicht verständlich, daß sie von vielen aeroben Mikroorganismen verwertet werden (OMELIANSKI, 1905 - 1914; BEIJERINCK und FOLPMERS, 1916). QUASTEL und Mitarbeiter (1924, 1925, 1929) fanden, daß die $C_4$-Dicarbonsäuren auch für anaerob wachsende Bakterien gute Substrate darstellen. Die Umsetzung von Malat zu Lactat durch verschiedene Milchsäurebakterien spielt z.B. bei der Vergärung des Weins eine wichtige Rolle (AMERINE und KUNKEE, 1968). Zahlreiche phototrophe Bakterien können Malat oder zuweilen auch Fumarat als H-Donator und als C-Quelle verwenden (PFENNIG, 1967). Die Fähigkeit zur Verwertung von Malat schließt jedoch, z.B. bei Streptococcus faecalis, nicht unbedingt auch Wachstum auf Fumarat ein (DEIBEL, 1964). Im Gegensatz zu Malat dient Fumarat unter anaeroben Bedingungen nur wenigen Organismen als einzige C- und Energiequelle, obwohl sich die beiden Säuren im Redoxgrad nicht unterscheiden und durch die Fumarase-Reaktion miteinander im Gleichgewicht stehen. Desulfovibrio gigas disproportioniert Fumarat und L-Malat in Abwesenheit von Sulfat zu Acetat, $CO_2$ und Succinat als einzigen Gärprodukten (MILLER und WAKERLEY, 1966). Enterobacter aerogenes ist ebenfalls in der Lage, Fumarat und Malat einerseits zu Acetat zu oxidieren, andererseits zu Succinat zu reduzieren, bildet aber außer Succinat weitere reduzierte Produkte wie Äthanol und $H_2$ (BARKER, 1936).

Die Bedeutung von Fumarat im Katabolismus zahlreicher anaerober Organismen besteht in seiner Funktion als Elektronenakzeptor bei der Oxidation eines weiteren Substrats wie Glycerin, Lactat, Formiat oder auch Glucose (QUASTEL und WOOLDRIDGE, 1929; KREBS, 1937; DEIBEL und KVETKAS, 1964). Escherichia coli wächst anaerob sehr gut auf Glycerin plus Fumarat, kann die beiden Substrate allein jedoch nicht verwerten (QUASTEL et al., 1925). Ebenso

benötigt dieser Organismus zum anaeroben Wachstum auf L-Malat $H_2$ als Elektronendonator (MACY et al., 1976).

Die Vergärung von Substratpaaren wie Lactat/Fumarat oder Glycerin/Fumarat ähnelt formal der bei einigen peptolytischen Clostridien beobachteten Stickland-Reaktion. Hierbei wird z.B. die Desaminierung und oxidative Decarboxylierung von Alanin zu Acetat mit der reduktiven Desaminierung von Glycin gekoppelt (STADTMAN, 1966b). Energie wird ähnlich wie bei der Fumaratoxidation durch Substratphosphorylierung (aus Acetylphosphat) gewonnen. Zusätzliche Elektronentransport-Phosphorylierung durch das Glycin-Reduktase-System gilt bislang als nicht gesichert (DECKER et al., 1970; BARKER, 1972).

Der Elektronentransport vom Glycerin zum Fumarat ist bei Escherichia coli mit der Phosphorylierung von ADP verbunden (MIKI und LIN, 1975). BARTON et al. (1972) wiesen bei Desulfovibrio gigas Energiegewinnung durch Fumaratreduktion mit $H_2$ als Elektronendonator nach. Bei Propionibakterien deuten ungewöhnlich hohe Ertragskoeffizienten in Gegenwart von Fumarat auf Elektronentransport-Phosphorylierung in Verbindung mit der Fumarat-Reduktase hin (DE VRIES et al., 1973). Auch Eukaryonten, die wie z.B. der Spulwurm (Ascaris lumbricoides) an eine vorwiegend anaerobe Lebensweise angepaßt sind, dient die Fumaratreduktion zur ATP-Bildung (REW und SAZ, 1974). Ebenso garantiert diese Reaktion Delphinen und anderen tauchenden Säugetieren ausreichende Energieversorgung bei $O_2$-Mangel (OWEN und HOCHACHKA, 1974).

Die Verwertung von $C_4$-Dicarbonsäuren durch Clostridien wurde bisher wenig untersucht. Das thermophile C. tartarivorum wächst auf Fumarat und L-Malat in Gegenwart von Acetat (MERCER und VAUGHN, 1951). C. acetobutylicum vermag Glycerin nur bei Zusatz von Fumarat zum Medium als Substrat zu nutzen (EGOROV et al., 1972). Gewaschene Zellen von C. tetanomorphum setzen Fumarat und L-Malat um (WOODS und CLIFTON, 1937).

EL GHAZZAWI (1967) und ANDREESEN et al. (1970) wiesen nach, daß auch der Homoacetatgärer C. formicoaceticum Fumarat und Malat

verwerten kann. Der Organismus besitzt ein breites Substratspektrum (ANDREESEN et al., 1970). Bei Vergärung von Fructose, Gluconat und Pyruvat werden als Produkte vorwiegend Acetat und $CO_2$ sowie gelegentlich etwas Formiat gebildet (ANDREESEN, 1969; ANDREESEN et al., 1974). Zum Ausgleich der Redoxbilanz reduziert C. formicoaceticum auf dem auch bei C. thermoaceticum und anderen Anaerobiern nachgewiesenen Homoacetatweg $CO_2$ zu Acetat (LJUNGDAHL und WOOD, 1969). Eine Untersuchung der Vergärung von Fumarat und L-Malat durch C. formicoaceticum stand jedoch noch aus. Es war zu prüfen, ob bei der Verwertung der Dicarbonsäuren wie beim Wachstum auf anderen Substraten Acetat als Hauptgärprodukt entstand. Andererseits war eine Disproportionierung zu Acetat, $CO_2$ und Succinat wie bei Desulfovibrio gigas (MILLER und WAKERLEY, 1966) denkbar.

Die Aufklärung des Gärverlaufs mit Fumarat und L-Malat als Substraten erschien auch unter energetischen Aspekten interessant. Die Ertragskoeffizienten $Y_m$ beim Wachstum auf den Dicarbonsäuren ließen in Verbindung mit den aufzustellenden Gärbilanzen Hinweise darauf erwarten, wieviel Energie der Organismus bei der Verwertung dieser Substrate gewinnen konnte. Für C. thermoaceticum wird beispielsweise auf Grund hoher Ertragskoeffizienten beim Wachstum auf Hexosen und Xylose zusätzliche Energiegewinnung im Verlauf der $CO_2$-Reduktion zu Acetat angenommen (ANDREESEN et al., 1973). Es war daher nicht auszuschließen, daß auch bei der Fumarat- und Malatvergärung durch C. formicoaceticum andere Reaktionen als allein die Substratphosphorylierung ATP-Bildung ermöglichten. Eine mit der Fumarat-Reduktion gekoppelte Elektronentransport-Phosphorylierung war ebenfalls vorstellbar.

Bisher wurden bei keinem der Clostridien, die Fumarat oder Malat verwerten können, die an der Vergärung dieser Substrate beteiligten Reaktionen beschrieben. Daher erschien es wichtig, auch die für die Umsetzung der Dicarbonsäuren verantwortlichen Enzyme in C. formicoaceticum nachzuweisen.

## II. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

### 1. Wachstumsversuche mit Clostridium formicoaceticum

#### 1.1. Wachstum auf Fumarat

Clostridium formicoaceticum wächst in einem Komplexmedium, das Hefeextrakt und Metalle enthält, mit Fumarat als Substrat (ANDREESEN et al., 1970). Während der Organismus bei der Verwertung von Fructose 240 mM Bicarbonat oder 60 mM Formiat als zusätzliche Elektronenakzeptoren benötigt (ANDREESEN et al., 1970), findet gutes Wachstum auf Fumarat auch in Abwesenheit von Bicarbonat oder Formiat statt.

##### 1.1.1. Optimierung der Wachstumsbedingungen

Um möglichst hohe Zellausbeuten und schnelles Wachstum auf Fumarat zu erzielen, sollte überprüft werden, ob die für Fructoseverwertung gefundenen optimalen Konzentrationen an Bicarbonat (240 mM) bzw. Formiat (60 mM) auch die Fumaratverwertung günstig beeinflußten.

###### 1.1.1.1. Bestimmung der optimalen Fumaratkonzentration

In Gegenwart verschiedener Bicarbonatmengen (zwischen 24 und 180 mM $NaHCO_3$) wurde das Wachstum von C. formicoaceticum mit 10 bis 100 mM Fumarat beobachtet, indem die Trübungszunahme bei 600 nm direkt in anaerob verschlossenen Teströhrchen (Fa. Bausch & Lomb) gemessen wurde. Alle verwendeten Nährlösungen enthielten 5 g Hefeextrakt/Liter sowie verschiedene Metallsalze (u.a. Fe-, Se- und Mo-) und Pyridoxin als notwendiges Vitamin (ANDREESEN et al., 1970). Abb. 1 zeigt den Wachstumsverlauf mit 10, 50 und 100 mM Fumarat in Gegenwart von 120 mM Bicarbonat. Die höchste Dichte wurde mit 100 mM Fumarat erzielt. In dieser Kultur blieb auch die Beweglichkeit der Zellen am längsten erhalten.

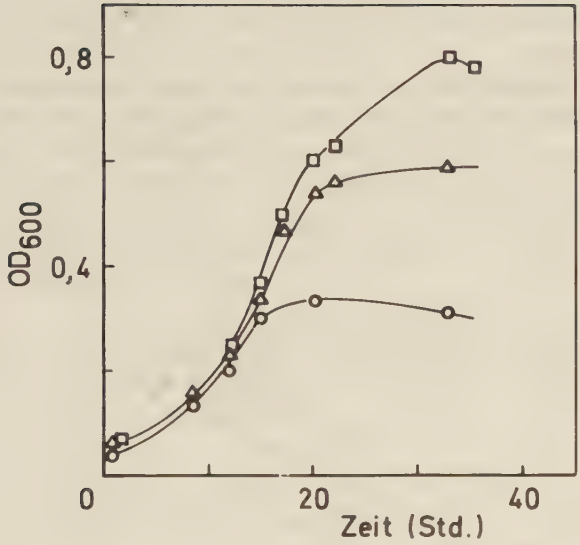



Abb. 1 Wachstum von C. formicoaceticum bei verschiedenen Fumaratkonzentrationen

Die komplexen Nährlösungen enthielten 120 mM Na-Bicarbonat. Zusammensetzung der Nährlösung siehe Methoden. Beimpft wurde im Verhältnis 1 : 50 mit einer gut wachsenden Vorkultur (100 mM Fumarat, 60 mM Bicarbonat). Die OD (600 nm) der 10 ml-Kulturen wurden direkt in anaerob verschlossenen Röhrchen im Spectronic 20-Spektralphotometer gegen unbeimpfte Nährlösung gemessen.

o———o 10 mM Fumarat, △———△ 50 mM Fumarat

□———□ 100 mM Fumarat

Noch höhere Substratkonzentrationen (150 mM) bewirkten weder einen weiteren Anstieg der Trübung noch eine Verkürzung der lag-Phase. Es ist dabei zu bemerken, daß die Trübungen in den Röhrchen ohne Verdünnung der Proben gemessen wurden; die tatsächlich erzielten optischen Dichten lagen folglich höher als die angegebenen Werte.

1.1.1.2. Bestimmung der optimalen Bicarbonat- und Formiatkonzentrationen

Beim Wachstum mit 100 mM Fumarat dauerte die lag-Phase um so länger, je niedriger die Bicarbonatkonzentration war. Eine Kultur mit 120 mM Bicarbonat zeigte die kürzeste Anlaufphase. Weitere Erhöhung der Konzentration verlängerte die lag-Phase wieder (Abb. 2).

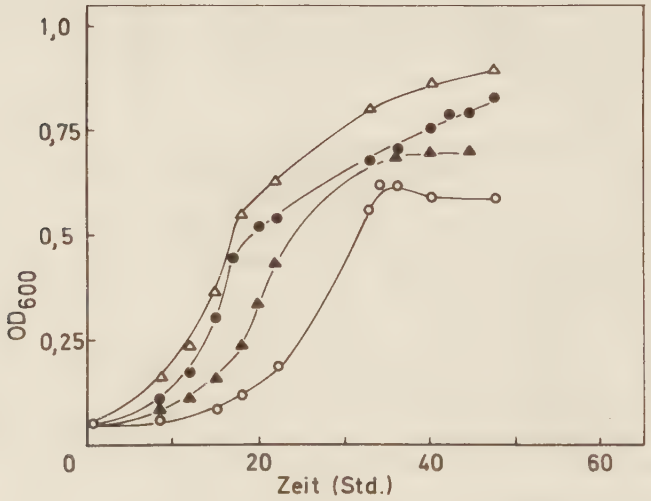



Abb. 2 Bestimmung der optimalen Bicarbonatkonzentration beim Wachstum auf 100 mM Fumarat

Zur Messung der OD (600 nm) siehe Legende zu Abb. 1.
○——○ 24 mM $NaHCO_3$, △——△ 120 mM $NaHCO_3$,
●——● 60 mM $NaHCO_3$, ▲——▲ 180 mM $NaHCO_3$

Bei Fructoseverwertung bewirkten Bicarbonatkonzentrationen um 200 mM noch keine Verzögerung des Wachstums (ANDREESEN et al., 1970.)

Nach etwa 15 Stunden Wachstum setzte in Gegenwart von 60 bzw. 120 mM Bicarbonat Sporenbildung ein, die sich in einer Verlangsamung des Trübungsanstiegs äußerte. Ebenfalls stufenförmigen Wachstumsverlauf und Sporulation zeigte C. formicoaceticum auch bei Anzucht auf D-Ribose (GOTTWALD, 1973). Beim Wachstum in Flüssigkeitskulturen mit Fructose wurden dagegen kaum Sporen gebildet (ANDREESEN, 1969).

Aus der Trübungszunahme ließ sich für eine Kultur, die mit 100 mM Fumarat und 120 mM Bicarbonat wuchs, eine Generationszeit von etwa 5 Stunden errechnen.

Die relativ hohe $Na^+$-Konzentration schien keinen hemmenden Einfluß auf das Wachstum auszuüben, denn der Einsatz von $KHCO_3$ lieferte identische Ergebnisse.

Enthielten die 10 ml-Kulturen zwischen 60 und 225 mM Na-Formiat bei einer Fumaratkonzentration von 100 mM, war in jedem Falle eine deutlich längere lag-Phase zu verzeichnen als in Abwesenheit von Bicarbonat (Abb. 3). Nach Überwindung der Anlaufphase wurde jedoch das schnellste Wachstum überhaupt mit 120 mM Formiat erzielt. Höhere Formiatgehalte bewirkten wiederum eine Verzögerung des Wachstums.

Im optimalen Konzentrationsbereich für Formiat wurden höhere Trübungen erreicht als bei der günstigsten Bicarbonatkonzentration. Die aus der Zunahme der Dichte berechnete Generationszeit betrug etwa 3,5 Stunden. Zudem war in Gegenwart von Formiat nur gelegentlich eine geringe Sporenbildung zu beobachten. In formiathaltigen Kulturen wurden jedoch häufig sehr lange, offenbar teilungsgehemmte Zellen mit einzelnen endständigen "Minizellen" gebildet. Schon BREDEMANN (1909) und IMŠENECKI (1934) beschrieben kokkenähnliche Zellen bei anaeroben Sporenbildnern. Lange, verdickte Zellen fand auch LINKE (1967) bei C. aceticum (= C. formicoaceticum), wenn der Organismus auf Pyruvat wuchs.

Wurde der Nährlösung weder Bicarbonat noch Formiat zugesetzt, war die lag-Phase kürzer als in Gegenwart von Formiat, aber länger

als mit Bicarbonat (Abb. 2 und 3). Auch hier wurden hohe Dichten erreicht, ohne daß Sporenbildung eintrat.

Aus der Trübungszunahme ergab sich eine Generationszeit von etwa 3 Stunden.

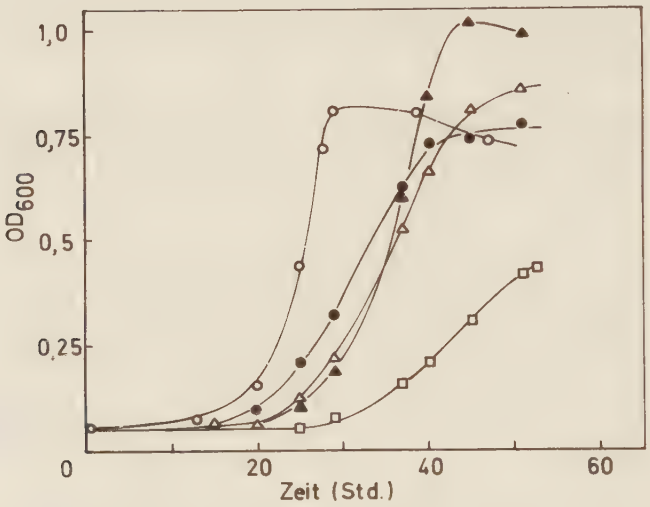



Abb. 3 Bestimmung der optimalen Formiatkonzentration beim Wachstum auf 100 mM Fumarat

Messung der OD (600 nm) erfolgte wie in Legende zu Abb. 1 beschrieben. Beimpft wurde mit einer gut wachsenden Vorkultur (100 mM Fumarat, ohne Bicarbonat).

○———○ Ohne Bicarbonat und Formiat
△———△ 60 mM Formiat
●———● 30 mM Formiat
▲———▲ 120 mM Formiat
□———□ 150 bzw. 225 mM Formiat

1.1.1.3. Bestimmung des optimalen pH-Wertes für das Wachstum auf Fumarat

Wurde der pH-Wert der Nährlösung vor dem Beimpfen auf pH 7 eingestellt, erfolgte in Gegenwart von Formiat sowie in Abwesenheit von Formiat und Bicarbonat kein oder nur langsames Wachstum (Abb. 4A und B).

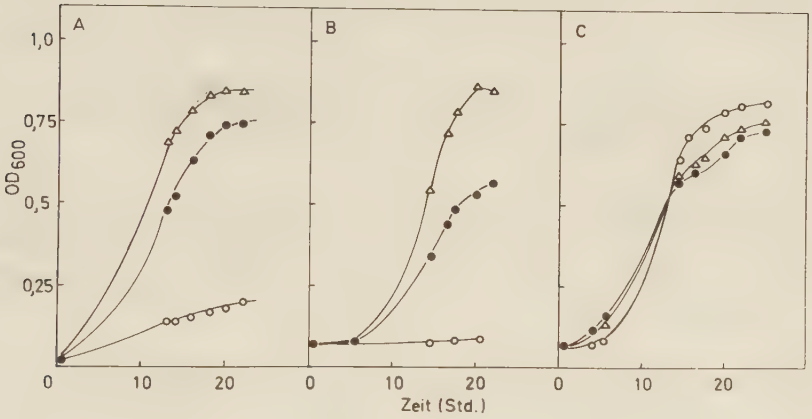



Abb. 4 Abhängigkeit des Wachstums auf Fumarat vom pH-Wert der Nährlösung

Das Komplexmedium enthielt 100 mM Fumarat sowie
A) weder Bicarbonat noch Formiat, B) 120 mM Formiat und
C) 120 mM Bicarbonat. Der pH-Wert der Nährlösung wurde vor dem Beimpfen eingestellt. Die Trübung der 10 ml-Ansätze wurde direkt in anaerob verschlossenen Röhrchen im Spectronic 20-Spektralphotometer bei 600 nm gemessen. Beimpft wurde jeweils mit Kulturen entsprechender Zusammensetzung (siehe A, B, C).

o——o pH 7, ●——● pH 8, △——△ pH 9

Dagegen nahm in einer bicarbonathaltigen Kultur die Trübung schnell zu (Abb. 4C). Mit Bicarbonat wuchs C. formicoaceticum auch bei pH 8 und 9 mit unverminderter Rate. In Gegenwart von Formiat bzw. ohne Bicarbonat war bei pH 8 eine mittlere und erst

bei pH 9 eine optimale Wachstumsrate zu verzeichnen. Bei pH 9 wurden in diesen beiden Kulturen auch die höchsten Dichten erzielt.

### 1.1.2. Wachstumsversuche

In Wachstumsversuchen mit C. formicoaceticum unter optimalen Bedingungen sollten die wichtigen Parameter wie Substratverbrauch, Produktbildung, Trockengewichts- und Proteinzunahme sowie die Wachstumsrate μ und der molare Ertragskoeffizient $Y_m$ ermittelt werden.

#### 1.1.2.1. Wachstum auf Fumarat in Abwesenheit von Bicarbonat und Formiat

Wurde C. formicoaceticum aus einer bicarbonat- und formiatfreien Vorkultur in 1 l frische Nährlösung gleicher Zusammensetzung übertragen, erfolgte schnelles Wachstum bis zu einer $OD_{600}$ von etwa 1,5 (Abb. 5A).

Tab. 1 Wachstumsraten und Verdopplungszeiten beim Wachstum auf Fumarat

| Anzuchtsbedingungen | μ (Std.$^{-1}$) | $t_d$ (Std.) |
|---|---|---|
| Ohne Bicarbonat und Formiat | 0,24 | 2,9 |
| 120 mM Bicarbonat | 0,156 | 4,45 |
| 120 mM Formiat | 0,166 | 4,2 |

Die Nährlösung enthielt jeweils 100 mM Fumarat. Einzelheiten bezüglich Zusammensetzung des Mediums und Durchführung der Trockengewichtsbestimmungen siehe Methoden. Die Daten für die Berechnungen wurden Abb. 5A, 8A und 9A entnommen.

Dabei änderte sich der pH-Wert nur wenig. Das maximal erreichte Trockengewicht der Zellen lag bei 0,7 mg/ml Kulturflüssigkeit.

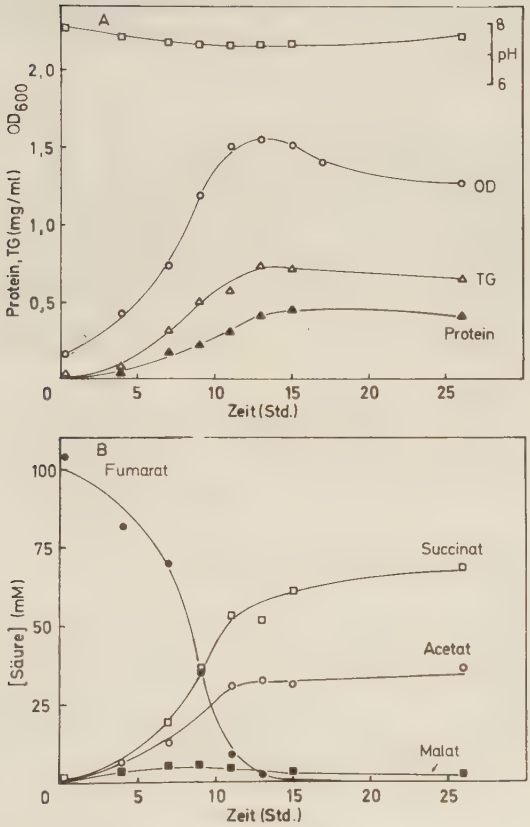



Abb. 5 Wachstum auf Fumarat in Abwesenheit von Bicarbonat und Formiat

A) Zunahme von Protein, Trockengewicht und optischer Dichte (bei 600 nm) sowie pH-Verlauf
B) Substratverbrauch und Produktbildung

Zusammensetzung der Nährlösung und Bestimmung der angegebenen Parameter siehe Methoden. Beimpft wurde mit einer gut wachsenden Vorkultur gleicher Zusammensetzung im Verhältnis 1 : 50.

Der Proteinanteil am Trockengewicht betrug während des gesamten Wachstums konstant etwa 60 %. Aus der Trockengewichtszunahme während der log-Phase ließen sich Wachstumsrate und Verdopplungszeit berechnen (Tab. 1).

Wie ein Vergleich von Abb. 5A und B zeigt, nahm die Trübung nach dem vollständigen Verbrauch des Fumarats wieder ab. Aus Abb. 5B ist weiterhin zu ersehen, daß im Verlauf des Wachstums auf Fumarat L-Malat vorübergehend bis zu einer Konzentration von etwa 5 mM ausgeschieden wurde. Demnach wurde die Umsatzgeschwindigkeit des Fumarats durch die Aufnahme bzw. den weiteren Abbau des Malats und nicht durch den ersten Schritt, die Hydratisierung zu Malat, begrenzt.

Als Gärungsendprodukte wurden Acetat, Succinat und $CO_2$ im Verhältnis 1 : 2 : 2 gebildet (Tab. 2).

Tab. 2 Substratverbrauch und Produktbildung beim Wachstum auf Fumarat

| Anzuchtsbedingungen | Substratverbrauch (mM) | | Produktbildung (mM) | | | C-Bilanz (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Fumarat | Formiat | Succinat | Acetat | $CO_2$ [1] | |
| Ohne Bicarbonat und Formiat | 100 | - | 65 | 35 | 70 | 100 |
| 120 mM Bicarbonat | 100 | - | 63 (40) | 38 (80) | 69 (80) | 99 |
| 120 mM Formiat | 100 | 117 | 75 | 25 | 106 | 88 [2] |

Die Daten wurden Abb. 5B, 8B (Werte in Klammern) und 9B sowie für 120 mM Bicarbonat einem weiteren Wachstumsversuch entnommen und auf 100 mM Substratverbrauch umgerechnet.

1) Die $CO_2$-Konzentrationen wurden an Hand der gemessenen Säuremengen errechnet.

2) Der Wert wurde berechnet unter der Voraussetzung, daß die gesamte eingesetzte Formiatmenge zur Gärung verbraucht wurde (Erläuterungen im Text).

In Abb. 6 sind die an der Vergärung von Fumarat beteiligten Enzymreaktionen dargestellt, auf die im einzelnen in Kap. 3 eingegangen werden soll.

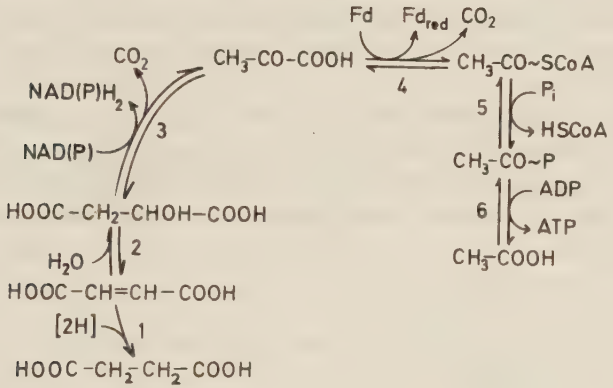



Abb. 6 Schematische Darstellung der an der Fumarat- und Malatvergärung bei C. formicoaceticum beteiligten Reaktionen

1 Fumarat-Reduktase
2 Fumarase
3 Malat-Enzym (Malat-Dehydrogenase, decarboxylierend)
4 Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase
5 Phosphotransacetylase
6 Acetat-Kinase

Die $CO_2$-Konzentration ist durch die gebildete Acetatmenge festgelegt (siehe allgemeine Gärgleichung).

Die beobachtete Umsetzung von Fumarat in Abwesenheit von Bicarbonat und Formiat läßt sich als einfache Gleichung formulieren:

$$6 \text{ Fumarat} \longrightarrow 2 \text{ Acetat} + 4 \text{ Succinat} + 4 \text{ CO}_2$$

Es ist zu erkennen, daß hierbei die im Verlauf der Oxidation zu Acetat entstehenden 2 x [2H] vollständig zur Fumaratreduktion genutzt wurden. Weiterhin zeigt Tab. 2, daß keine Reduktionsäquivalente zum Wachstum abgezogen wurden; ob $CO_2$ in die Zellsubstanz

eingebaut wurde, läßt sich nicht entscheiden. Als C-Quelle zum Aufbau von Zellmaterial dürften auch hier ähnlich wie bei der Fructoseverwertung (ANDREESEN, 1969) die Bestandteile des Hefeextrakts verwendet werden.

Eine ähnliche Disproportionierung von Fumarat zu Succinat und Acetat beschrieben MILLER und WAKERLEY (1966) beim Wachstum von Desulfovibrio gigas auf Fumarat in sulfatfreiem Medium.

Der molare Ertragskoeffizient $Y_m$ wurde nach der von STOUTHAMER (1969) beschriebenen Methode bestimmt. Voraussetzung zur Bestimmung von $Y_m$ ist erstens, daß das Substrat nur der Energiegewinnung der Zelle dient und nicht als C-Quelle oder zur Speicherung verwendet wird.

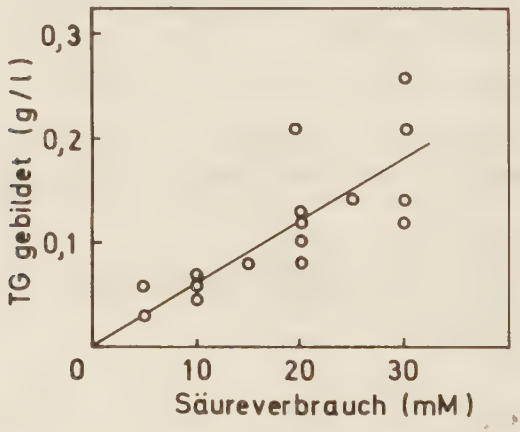



Abb. 7 Bestimmung der molaren Ertragskoeffizienten $Y_m$ beim Wachstum auf Fumarat in Abwesenheit von Bicarbonat und Formiat

Aufgetragen wurde die Trockengewichtszunahme innerhalb verschiedener Zeiträume gegen den entsprechenden Fumaratverbrauch. Gleichzeitige Malatbildung oder -aufnahme wurde vom Substratverbrauch abgezogen bzw. hinzugezählt. Die Werte wurden Abb. 5A und B entnommen.

Diese Bedingung schien im Falle der Fumaratverwertung durch C. formicoaceticum erfüllt zu sein, da nahezu 100% des Substratkohlenstoffs in den Gärungsprodukten nachweisbar waren und das Verhältnis von Protein zu Trockengewicht Speicherung ausschloß. Zweitens muß das Substrat das Wachstum begrenzen. Da C. formicoaceticum jedoch bei niedrigen Substratkonzentrationen schwaches und nicht gut reproduzierbares Wachstum zeigte und nur geringe Dichten erreichte, wurden die $Y_m$-Werte bei höherem Substratangebot aus der Trockengewichtszunahme während des logarithmischen Wachstums bestimmt. Allerdings erhielten HADJIPETROU et al. (1964) bei Enterobacter (Aerobacter) aerogenes höhere Y-Werte bei niedrigen Substratkonzentrationen. Die erhaltenen Ertragskoeffizienten sind somit nur als Näherung zu betrachten. Die Tatsache, daß C. formicoaceticum nach Erreichen der stationären Phase meist zu lysieren begann, war ein weiterer Grund dafür, $Y_m$ aus der Trockengewichtszunahme während der log-Phase in Relation zum Substratverbrauch zu bestimmen (Abb. 7). Durch graphische Mittelung der Werte aus Abb. 5 ergab sich ein molarer Ertragskoeffizient von etwa 6 g Trockengewicht pro mol Fumarat (Tab. 3).

Tab. 3 Molare Ertragskoeffizienten $Y_m$ beim Wachstum auf Fumarat

| Anzuchtsbedingungen | $Y_m$ (g TG/mol Substrat) |
|---|---|
| Ohne Bicarbonat und Formiat | 6,0 |
| 120 mM Bicarbonat | 6,0 |
| 120 mM Formiat | 5,0 |

Die genannten Werte wurden durch graphische Auftragung von Substratverbrauch gegen Trockengewichtszunahme erhalten (Abb. 7). Die Daten wurden Abb. 5, 8 und 9 und im Falle des bicarbonatabhängigen Wachstums noch zwei weiteren Wachstumsversuchen entnommen.

1.1.2.2. Wachstum auf Fumarat in Gegenwart von Bicarbonat

Kulturen in 1 l-Meßkolben wie auch größere Ansätze zeigten in Gegenwart von 120 mM Bicarbonat sehr unterschiedliches Wachstum. Häufig setzte schon bei einer optischen Dichte (600 nm) von 0,5 - 0,8 Sporulation ein (in Abb. 8A durch einen Pfeil gekennzeichnet), obwohl auch weiterhin noch in Teilung begriffene Zellen zu beobachten waren. Der Proteingehalt stieg dabei noch leicht an. Allerdings wurden nur relativ niedrige Trockengewichts- und Proteinkonzentrationen (0,46 bzw. 0,28 mg/ml) erreicht. Die Verdopplungszeit während des Wachstums vor Beginn der Sporulation war mit 4,5 Stunden deutlich länger als in Abwesenheit von Bicarbonat (Tab. 1).

Es ist bemerkenswert, daß Sporulation einsetzte, bevor das Substrat vollständig verbraucht war (Abb. 8B). Während in Abwesenheit von Bicarbonat nur wenig L-Malat zwischenzeitlich ausgeschieden wurde, erreichte die Malatkonzentration beim Wachstum auf 100 mM Fumarat mit Bicarbonat etwa 20 mM. Während dieses Malat abgebaut wurde, schien die Fumaratverwertung verlangsamt zu sein. Auch Acetat wurde vorübergehend mit geringerer Rate gebildet. Nur die Succinatkonzentration stieg gleichmäßig weiter an. Außerdem fällt auf, daß die Gärung in der beschriebenen Kultur zu Beginn des Wachstums deutlich mehr Acetat als Succinat lieferte. Die Umsetzung von 100 mM Fumarat in Gegenwart von 120 mM Bicarbonat führte jedoch meistens zu einer Gärbilanz, die den in Abwesenheit von Bicarbonat gefundenen Werten entsprach. Es wurden im Mittel 63 mM Succinat und 38 mM Acetat gebildet (Tab. 2).

Die Ausscheidung von Formiat wurde auch unter ungünstigen Wachstumsbedingungen nicht beobachtet. Bei Vergärung von Fructose bildete C. formicoaceticum während der stationären Phase deutlich meßbare Mengen Formiat (ANDREESEN et al., 1970).

Da Fumarat bei dem in Abb. 8 dargestellten Experiment im Versuchszeitraum noch nicht vollständig umgesetzt worden war, wurde das Verhältnis zwischen Produktbildung und Substratverbrauch durch graphische Auftragung der Werte aus Abb. 8B bestimmt.

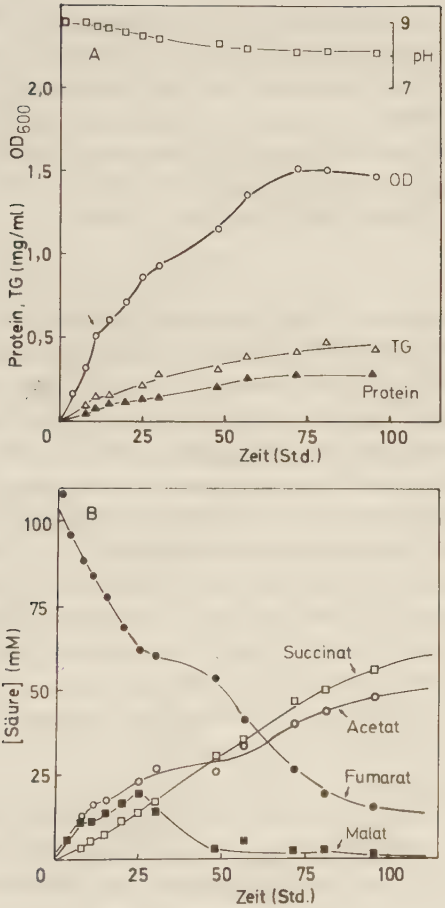



Abb. 8 Wachstum auf Fumarat in Gegenwart von 120 mM Bicarbonat

A) Zunahme von Protein, Trockengewicht und optischer Dichte sowie pH-Verlauf
B) Substratverbrauch und Produktbildung

Zusammensetzung der Nährlösung und Bestimmung der angegebenen Parameter siehe Methoden. Beimpft wurde im Verhältnis 1 : 50 mit Zellen aus einer gut wachsenden Vorkultur gleicher Zusammensetzung.

→ markiert in Abb. 8A den Beginn der Sporulation

Es ergab sich hierbei pro 100 mM Fumaratverbrauch die Bildung von 80 mM Acetat und 40 mM Succinat (Tab. 2, Werte in Klammern). In diesem Fall wurden bei verminderter Succinatproduktion überschüssige Reduktionsäquivalente zur Acetatsynthese aus $CO_2$ verwendet. Die Enzyme der Homoacetatgärung müssen folglich auch beim Wachstum auf Fumarat vorhanden sein. Die beteiligten Reaktionen wurden schon von O'BRIEN und LJUNGDAHL (1972) in C. formicoaceticum nachgewiesen.

Für eine gewisse Variabilität der Zellen in Gegenwart von Bicarbonat spricht, daß in weiteren Versuchen bei gleicher Zusammensetzung der Nährlösung im Gegensatz zu dem in Abb. 8 dargestellten Experiment immer 60 - 65 mM Succinat und nur etwa 35 mM Acetat gebildet wurden. Der einzige Unterschied dieser Kulturen zum anfangs beschriebenen Wachstumsversuch bestand darin, daß der bicarbonathaltige Puffer für diese Ansätze nach Einstellung auf pH 8,5 autoklaviert und vor dem Beimpfen mit sterilem $CO_2$ begast wurde. Als Anfangs-pH-Wert wurde nach dem Animpfen pH 8,3 - 8,5 gemessen. Der Puffer für den in Abb. 8 dargestellten Versuch wurde sterilfiltriert. Auch in den Kulturen mit autoklavierter Bicarbonatlösung setzte bei einer Trübung von ca. 0,8 (600 nm) Sporulation ein, so daß sich ein charakteristischer Verlauf der Wachstumskurve wie in Abb. 8A ergab.

Eine Beantwortung der Frage, auf welche Weise Bicarbonat wachsende Zellen von C. formicoaceticum regulatorisch beeinflußt, ist an Hand der vorliegenden Ergebnisse noch nicht möglich.

Der graphisch ermittelte Ertragskoeffizient $Y_m$ war mit dem beim Wachstum auf Fumarat ohne Bicarbonat erhaltenen Wert identisch (Tab. 3).

1.1.2.3. Wachstum auf Fumarat in Gegenwart von Formiat

Beim Wachstum auf Fumarat in Gegenwart von 120 mM Formiat erreichte C. formicoaceticum hohe optische Dichten (1,9), ohne daß Sporen gebildet wurden (Abb. 9A).

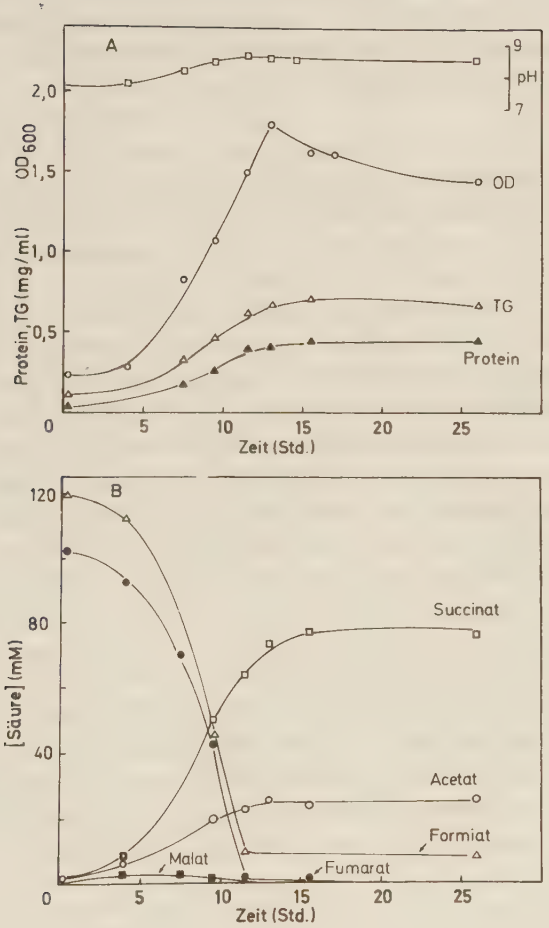



Abb. 9 Wachstum auf Fumarat in Gegenwart von 120 mM Formiat

A) Zunahme von Protein, Trockengewicht und optischer Dichte sowie pH-Verlauf
B) Substratverbrauch und Produktbildung

Erläuterungen siehe Legende zu Abb. 5.

Allerdings war die Verdopplungszeit (4,2 Stunden) nicht wesentlich kürzer als beim Wachstum in Anwesenheit von Bicarbonat (Tab. 1). Bedingt durch den Formiatverbrauch stieg der pH-Wert im Verlauf des Wachstums an.

Fumarat wurde, wie Abb. 9B zeigt, sehr schnell vollständig umgesetzt; es wurden dabei kurzzeitig nur 2 - 3 mM L-Malat ausgeschieden. Die Succinatendkonzentration lag mit 75 mM pro 100 mM Fumaratverbrauch deutlich höher, die Acetatkonzentration jedoch niedriger (25 mM) als beim Wachstum in Abwesenheit von Bicarbonat und Formiat (Tab. 2). Das veränderte Produktverhältnis weist darauf hin, daß Reduktionsäquivalente von Formiat auf Fumarat übertragen wurden; denn die im Verlauf der Acetatbildung verfügbar werdenden 2 x 25 mM [2H] ermöglichten nur die Bildung von 50 mM Succinat. Andererseits könnten die Reduktionsäquivalente des Formiats vollständig zur Acetatbildung und zur Fumaratreduktion verwendet worden sein. Die C-Bilanzen waren in beiden Fällen nicht ausgeglichen (82 bzw. 88%). Die Bildung anderer nicht identifizierter Gärprodukte ist nicht völlig auszuschließen. Weitere nicht flüchtige Säuren (z.B. Lactat) konnten bei gaschromatographischer Analyse allerdings nicht nachgewiesen werden.

Der ermittelte molare Ertragskoeffizient (5 g TG/mol Fumarat) lag niedriger als die in Gegenwart und Abwesenheit von Bicarbonat bestimmten Werte (Tab. 3). Jedoch läßt diese relativ geringe Abweichung bei der Schwankungsbreite der Daten noch keinen Schluß auf mögliche Änderungen im Energiehaushalt der Zellen in Anwesenheit von Formiat zu.

### 1.2. Wachstum auf L-Malat

Vorversuche hatten gezeigt, daß sich das Mengenverhältnis der Gärprodukte bei Verwertung von L-Malat deutlich von dem beim Wachstum auf Fumarat beobachteten unterschied. Es war zu prüfen, ob die für die Anzucht auf Fumarat ermittelten optimalen Bedingungen auch für die Kultivierung mit L-Malat als Substrat galten.

1.2.1. Optimierung der Wachstumsbedingungen

C. formicoaceticum wuchs bei L-Malatkonzentrationen zwischen 100 und 200 mM mit maximaler Geschwindigkeit und erreichte optische Dichten (600 nm) bis 2,0.

1.2.1.1. Bestimmung der optimalen Bicarbonat- und Formiatkonzentrationen

Auch auf L-Malat wurde Wachstum in Abwesenheit von Bicarbonat und Formiat beobachtet (Abb. 10). Die in den Teströhrchen ohne Verdünnung der Proben am Ende der log-Phase gemessene Trübung (600 nm) von 0,9 entsprach einem Wert von 1,5 - 2,0 nach Verdünnung (vgl. Abb. 13). Dagegen wurden bei Bicarbonatkonzentrationen unter 100 mM nur geringe Dichten erreicht, und die Zellen begannen nach Beendigung des Wachstums zu lysieren. Die kürzeste Anlaufphase wurde dann beobachtet, wenn die Nährlösung 120 mM Bicarbonat enthielt. Auch 180 mM Bicarbonat ermöglichten noch gutes Wachstum (Abb. 10).

In Anwesenheit von Formiat waren bei Malat- wie bei Fumaratverwertung längere lag-Phasen zu verzeichnen (Abb. 11). Schon bei geringen Formiatkonzentrationen (30 - 60 mM) wurde eine relativ hohe Trübung erzielt. C. formicoaceticum wuchs auf L-Malat mit maximaler Rate, wenn der Nährlösung zwischen 120 und 225 mM Formiat zugesetzt wurden.

Die Unempfindlichkeit malatverwertender Zellen gegenüber hohen Bicarbonat- und Formiatkonzentrationen steht im Gegensatz zu der deutlichen Wachstumshemmung, die schon 180 mM Bicarbonat bzw. 150 mM Formiat bei der Anzucht auf Fumarat bewirkten.

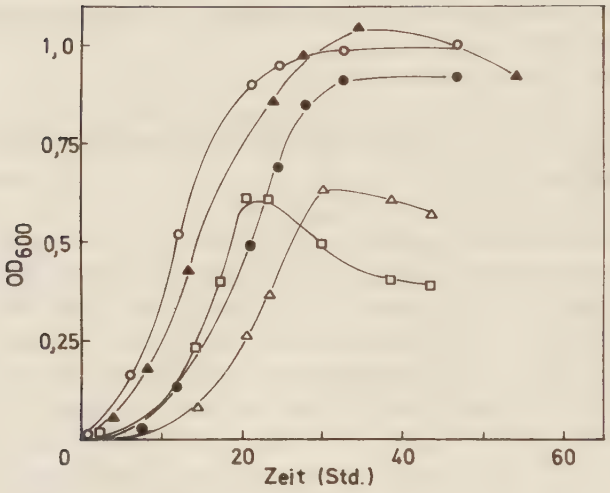



Abb. 10 Bestimmung der optimalen Bicarbonatkonzentration beim Wachstum auf 100 mM L-Malat

Durchführung der Versuche siehe Legende zu Abb. 1 und Methoden. Beimpft wurde im Verhältnis 1 : 50 mit einer Vorkultur, die 100 mM L-Malat und weder Bicarbonat noch Formiat enthielt.

●———● Ohne Bicarbonat und Formiat

△———△ 24 mM Bicarbonat

□———□ 84 mM Bicarbonat

○———○ 120 mM Bicarbonat

▲———▲ 180 mM Bicarbonat

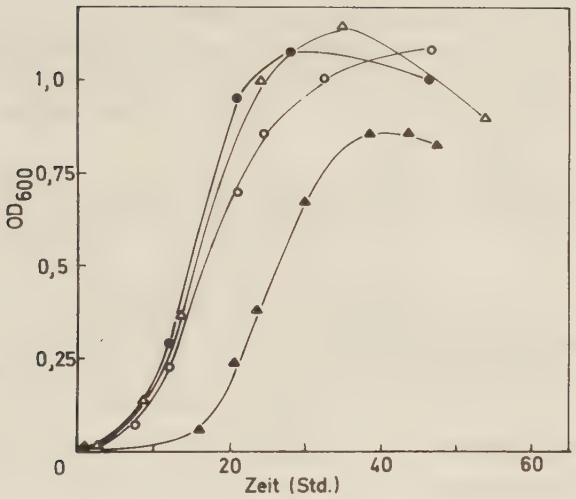



Abb. 11 Bestimmung der optimalen Formiatkonzentration beim Wachstum auf 100 mM L-Malat

Durchführung der Versuche siehe Legende zu Abb. 1 und Methoden.

▲———▲ 30 mM Formiat
o———o 60 mM Formiat
●———● 120 mM Formiat
△———△ 150 mM Formiat

1.2.1.2. Bestimmung des optimalen pH-Wertes für das Wachstum auf L-Malat

Aus Abb. 12 geht hervor, daß wie bei Fumaratverwertung auch beim Wachstum auf L-Malat eine unterschiedliche pH-Abhängigkeit in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Bicarbonat oder Formiat bestand. Nur bicarbonathaltige Kulturen zeigten bei einem Anfangs-pH von 7, 8 und 9 einen nahezu gleichen Wachstumsverlauf. Formiat bewirkte eine längere lag-Phase bei pH 7, während sich die Ansätze bei pH 8 und 9 kaum unterschieden.

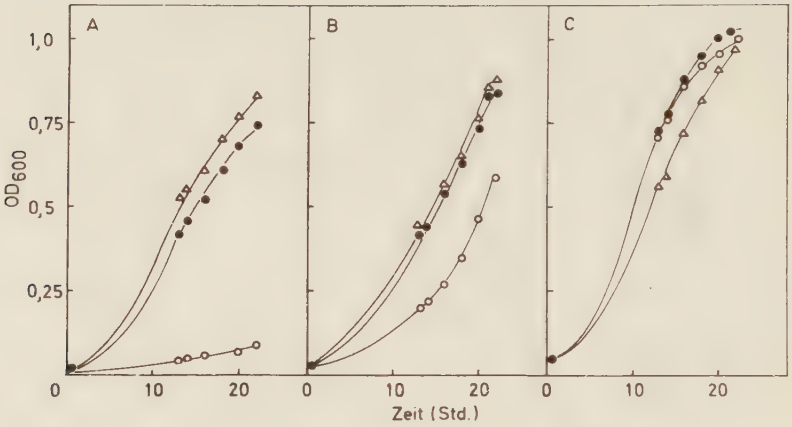



Abb. 12 Abhängigkeit des Wachstums auf L-Malat vom pH-Wert der Nährlösung

Das Komplexmedium enthielt 100 mM L-Malat sowie
A) weder Bicarbonat noch Formiat, B) 120 mM Formiat und
C) 120 mM Bicarbonat. Weitere Angaben zur Durchführung siehe Legende zu Abb. 4.

○———○ pH 7, ●———● pH 8, △———△ pH 9

In Abwesenheit von Bicarbonat und Formiat fand bei pH 7 innerhalb des Versuchszeitraumes nur sehr schwaches Wachstum statt; pH-Werte oberhalb 8 erlaubten auch unter diesen Bedingungen eine schnelle Zunahme der Zelldichte.

Demnach war Bicarbonat sowohl beim Wachstum auf Fumarat als auch auf L-Malat direkt oder indirekt regulatorisch wirksam. ANDREESEN et al. (1974) beobachteten einen Einfluß des Bicarbonats auch auf die Vergärung von Pyruvat durch C. formicoaceticum.

### 1.2.2. Wachstumsversuche

Wesentliches Ziel der Wachstumsversuche mit L-Malat war die quantitative Erfassung von Substratverbrauch und Gärproduktbildung. Dadurch sollten Unterschiede zwischen Fumarat- und Malatvergärung verdeutlicht werden.

#### 1.2.2.1. Wachstum auf L-Malat in Abwesenheit von Bicarbonat und Formiat

Wurde C. formicoaceticum auf L-Malat ohne Zusatz von Bicarbonat oder Formiat angezogen, war wesentlich langsameres Wachstum zu beobachten als bei einer vergleichbaren fumarathaltigen Kultur (Abb. 13). Es wurde jedoch eine etwas höhere optische Dichte erreicht. Die Verdopplungszeit betrug 8,25 Stunden (Tab. 4).

Tab. 4 Wachstumsraten und Verdopplungszeiten beim Wachstum auf L-Malat

| Anzuchtsbedingungen | $\mu$ (Std.$^{-1}$) | $t_d$ (Std.) |
|---|---|---|
| Ohne Bicarbonat und Formiat | 0,084 | 8,25 |
| 120 mM Bicarbonat | 0,054 | 12,8 |
| 120 mM Formiat | 0,10 | 6,9 |

Die Nährlösungen enthielten einheitlich 100 mM L-Malat. Einzelheiten siehe Methoden. Die den Berechnungen zugrunde liegende Trockengewichtszunahme wurde Abb. 13A, 14A bzw. 15A entnommen.

Durch graphische Auftragung von Trockengewichtszunahme gegen Malatverbrauch während des Wachstums (bis 20 Stunden) wurde ein molarer Ertragskoeffizient $Y_m$ von 8 g Trockengewicht/mol Substrat ermittelt (Tab. 5). Im gleichen Zeitraum betrug der Anteil des Proteins am Trockengewicht 43 - 59%. Der Wert von $Y_m$ ist höher als beim Wachstum mit Fumarat unter gleichen Bedingungen.

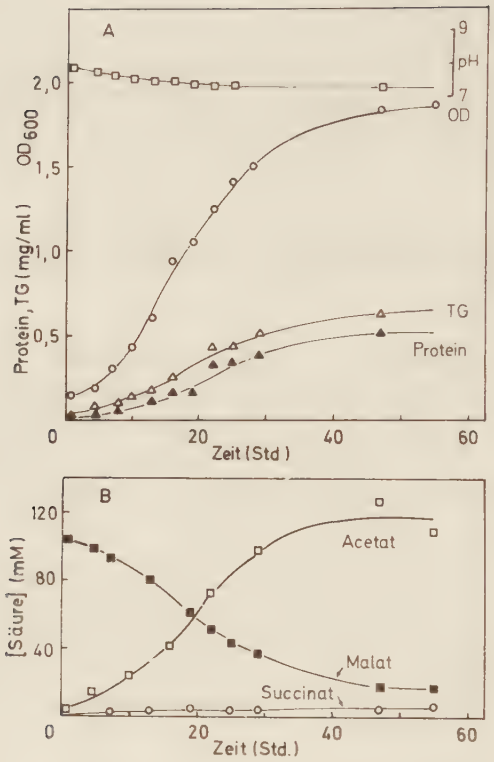



Abb. 13 Wachstum auf L-Malat in Abwesenheit von Bicarbonat und Formiat

A) Zunahme von Protein, Trockengewicht und optischer Dichte sowie pH-Verlauf
B) Substratverbrauch und Produktbildung

Zusammensetzung der Nährlösung und Bestimmung der angegebenen Parameter siehe Methoden. Beimpft wurde mit einer gut wachsenden Vorkultur gleicher Zusammensetzung im Verhältnis 1 : 50.

Das herausragendste Merkmal der Malatvergärung war die Bildung großer Mengen Acetat neben sehr wenig Succinat (Abb. 13B). Aus 100 mM L-Malat entstanden 6 mM Succinat und 136 mM Acetat (Tab. 6).

Tab. 5 Molare Ertragskoeffizienten $Y_m$ beim Wachstum auf L-Malat

| Anzuchtsbedingungen | $Y_m$ (g TG/mol Substrat) |
|---|---|
| Ohne Bicarbonat und Formiat | 8,0 |
| 120 mM Bicarbonat | 7,0 |
| 120 mM Formiat | 7,9 |

Die Werte wurden durch graphische Auftragung von Substratverbrauch und Trockengewichtszunahme ermittelt (Beispiel siehe Abb. 7). Die entsprechenden Daten wurden Abb. 13, 14 und 15 entnommen.

$CO_2$ wurde auch hier rechnerisch bestimmt; seine Konzentration ist wie bei der Vergärung von Fumarat durch die Säurebildung festgelegt.

Tab. 6 Substratverbrauch und Produktbildung beim Wachstum auf L-Malat

| Anzuchts-bedingungen | Substratverbrauch (mM) | | Produktbildung (mM) | | | C-Bilanz (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | L-Malat | Formiat | Succinat | Acetat | $CO_2$ [1] | |
| Ohne Bicarbonat und Formiat | 100 | - | 6 | 136 | 97 | 98 |
| 120 mM Bicarbonat | 100 | - | 7 | 132 | 96 | 97 |
| 120 mM Formiat | 100 | 112 | 2,5 | 157 | 142 | 91 [2] |

Die Daten wurden Abb. 13, 14 und 15 entnommen und auf 100 mM Substratverbrauch umgerechnet.

[1] Die $CO_2$-Konzentrationen wurden aus den Gärungsbilanzen berechnet.

[2] Dieser Wert wurde berechnet unter der Voraussetzung, daß Formiat vollständig zur Gärung verwendet wurde (Erläuterungen im Text).

Da nur sehr wenig Malat zu Succinat reduziert wurde, mußte der überwiegende Teil des Substrates zu Acetat oxidiert werden. Die dabei entstehenden Reduktionsäquivalente machten die Synthese weiteren Acetats aus $CO_2$ über den Homoacetatweg notwendig. Die Bilanz bestätigt dies. Andere reduzierte Endprodukte (z.B. Formiat oder Lactat) konnten nicht nachgewiesen werden.

1.2.2.2. Wachstum auf L-Malat in Gegenwart von Bicarbonat

In bicarbonathaltigen 1 l-Kulturen wurde L-Malat ähnlich wie Fumarat sehr langsam vergoren (Abb. 14). 10 ml-Ansätze wuchsen unter diesen Bedingungen wesentlich schneller. Möglicherweise bewirkte die mit der Probenentnahme verbundene wiederholte Rührung der Kulturen und die Vergrößerung des Gasvolumens über der Kulturflüssigkeit ($O_2$-freier Stickstoff) eine Wachstumsverzögerung. Als höchste optische Dichte bei 600 nm wurde nur ein Wert von 1,5 erreicht; die schnelle Abnahme der Trübung nach Beendigung des Wachstums weist darauf hin, daß die Zellen nach vollständigem Substratverbrauch zu lysieren begannen. Sporenbildung wurde nicht beobachtet. Die Verdopplungszeit betrug etwa 13 Stunden, also 5 Stunden mehr als in Abwesenheit von Bicarbonat (Tab. 4). Der wachstumsverzögernde Einfluß des Bicarbonats schien demnach bei Malatvergärung noch stärker wirksam zu werden als in Gegenwart von Fumarat.

Der molare Ertragskoeffizient, der sich aus der Trockengewichtszunahme in Relation zum Malatverbrauch während des Wachstums ergab, lag mit 7,0 g Trockengewicht/mol Substrat niedriger als der in Abwesenheit von Bicarbonat bestimmte Wert (Tab. 5).

Trotz des verlangsamten Wachstums wurde die Zusammensetzung der Gärprodukte durch Bicarbonat nicht verändert: es wurde überwiegend Acetat und fast kein Succinat gebildet (Tab. 6).

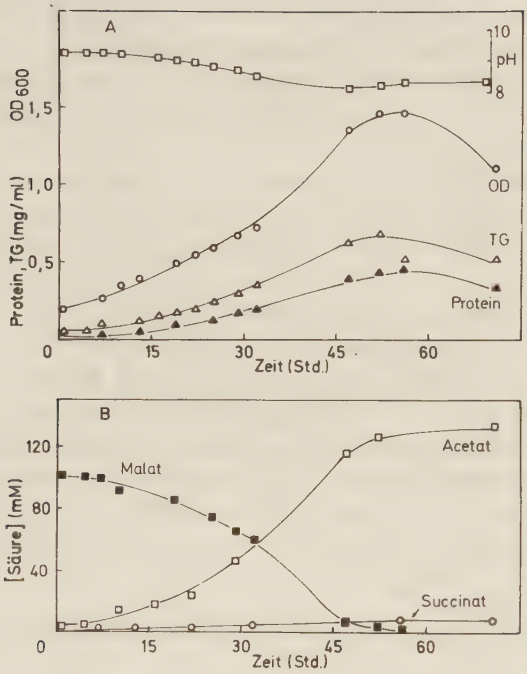



Abb. 14 Wachstum auf L-Malat in Gegenwart von 120 mM Bicarbonat

A) Zunahme von Protein, Trockengewicht und optischer Dichte sowie pH-Verlauf
B) Substratverbrauch und Produktbildung

Erläuterungen siehe Legende zu Abb. 13 und Methoden.

1.2.2.3. Wachstum auf L-Malat in Gegenwart von Formiat

In einer Malat und Formiat enthaltenden Kultur (1 l) wuchs C.formicoaceticum nahezu linear bis zu einer optischen Dichte von 2,0, lysierte allerdings relativ schnell wieder (Abb. 15A). Das erreichte Trockengewicht lag mit 0,9 mg/ml deutlich höher als unter den anderen Wachstumsbedingungen. Die Verdopplungszeit betrug nur 7 Stunden (Tab. 4).

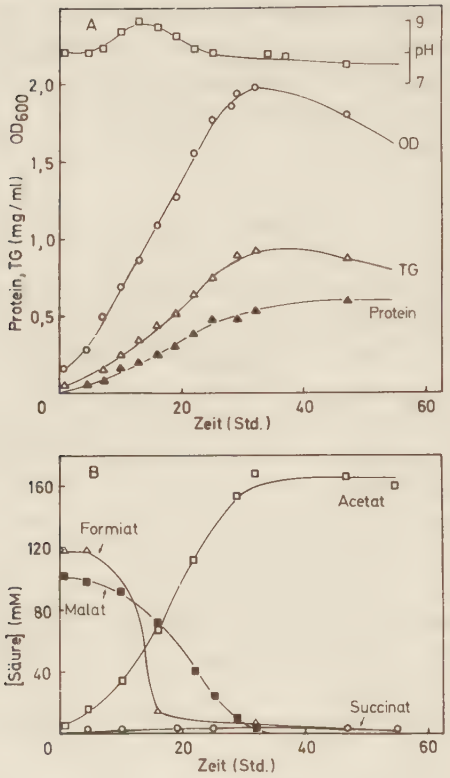



Abb. 15 Wachstum auf L-Malat in Gegenwart von 120 mM Formiat

A) Zunahme von Protein, Trockengewicht und optischer Dichte sowie pH-Verlauf
B) Substratverbrauch und Produktbildung

Erläuterungen siehe Legende zu Abb. 13 und Methoden.

Wie Abb. 15B zeigt, wurden Malat und Formiat in vergleichsweise kurzer Zeit vollständig umgesetzt. Infolge des Formiatverbrauchs stieg der pH-Wert an.

In Gegenwart von Formiat wurde mehr Acetat gebildet als in Kul-

turen ohne Formiatzusatz; die Succinatkonzentration blieb jedoch unverändert gering (Tab. 6). Die Reduktion von Fumarat zu Succinat war demnach beim Wachstum auf Malat auch in Anwesenheit von Formiat nicht möglich. Dies steht im Gegensatz zu dem bei Fumaratverwertung beobachteten Gärungsverlauf.

Der molare Ertragskoeffizient betrug 7,9 g Trockengewicht/mol Malat und stimmte somit gut mit dem für das Wachstum ohne Bicarbonat erhaltenen Wert überein (Tab. 5).

Die C-Bilanz (Tab. 6) war lediglich in Gegenwart von Formiat nicht ausgeglichen. Nimmt man an, daß Formiat vollständig durch Fumaratreduktion und Disproportionierung zu Acetat und $CO_2$ umgesetzt und nicht in die Zellsubstanz eingebaut wurde, bleibt ein Fehlbetrag von 14 mM Malat. Dies könnte allerdings ähnlich wie Fumarat in Gegenwart von Formiat zur Synthese von Zellmaterial verwendet worden sein. Die Ausscheidung anderer nicht identifizierter Gärprodukte ist jedoch auch hier nicht ganz auszuschließen.

### 1.3. Zusammenfassung der Wachstumsversuche mit Fumarat und L-Malat

Folgende Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten zwischen fumarat- und malatverwertenden Kulturen wurden festgestellt:

a) Mit Fumarat als energielieferndem Substrat erfolgte schneleres Wachstum als mit L-Malat. Die maximal erreichten optischen Dichten bei 600 nm lagen jedoch unter allen Anzuchtsbedingungen zwischen 1,5 und 2,0. Die kürzesten Verdopplungszeiten wurden beim Wachstum auf 100 mM Fumarat ohne Zusatz von Bicarbonat oder Formiat bzw. 100 mM L-Malat in Gegenwart von 120 mM Formiat beobachtet.
b) Vollständige Versporung fand nur beim Wachstum auf Fumarat in Gegenwart hoher Bicarbonatkonzentrationen (> 60 mM) statt.
c) Die molaren Ertragskoeffizienten $Y_m$ betrugen bei Vergärung von Fumarat 5 - 6 g Trockengewicht pro mol Substrat, während bei Malatvergärung 7 - 8 g Trockengewicht/mol gebildet wurden.

d) Die Vergärung von 3 molen Fumarat führte zu etwa 1 mol Acetat und 2 molen Succinat sowie 2 molen $CO_2$. Beim Wachstum auf Malat wurden dagegen nur Spuren von Succinat gebildet; das Substrat wurde ausschließlich zu Acetat und $CO_2$ vergoren. Zum Ausgleich der Redoxbilanz mußte $CO_2$ über den Homoacetatweg zu Acetat reduziert werden.

Zugesetztes Bicarbonat ging in die Gärungsbilanzen nicht ein. Formiat verschob dagegen das Produktverhältnis bei Fumaratvergärung zu mehr Succinat, bei Verwertung von Malat zu mehr Acetat.

e) Das Verhältnis zwischen Substratverbrauch und Produktbildung während des Wachstums unterschied sich im allgemeinen nur wenig von dem nach Beendigung des Wachstums bestimmten Wert. Ein Vergleich von Abb. 16 mit Tab. 2 und 6 zeigt, daß der Gärungsverlauf während aller Wachstumsphasen nahezu konstant blieb. Abb. 16 gibt an, wieviel Acetat bzw. Succinat pro 1 mol Substrat gebildet wurde. Die Werte wurden durch Auftragung von Produktbildung gegen Substratverbrauch und graphische Mittelung der Punkte erhalten. Als Beispiel ist in Abb. 17 die Bildung von Acetat und Succinat beim Wachstum auf Fumarat (in Abwesenheit von Bicarbonat) in der genannten Weise dargestellt.

f) Wie aus Tab. 7 ersichtlich ist, wiesen die O/R-Bilanzen auf ein ausgewogenes Redoxverhältnis zwischen Substrat und Produkten hin. Lediglich in Anwesenheit von Formiat waren die C- und Redoxbilanzen aus unbekannten Gründen nicht ausgeglichen.

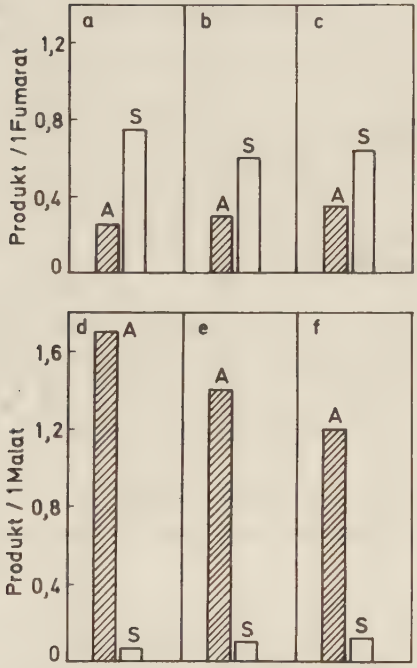



Abb. 16 Verhältnis der Succinat- und Acetatbildung zum Substratverbrauch während des Wachstums auf Fumarat und L-Malat

Das Diagramm gibt an, in welchem Verhältnis die Gärprodukte Acetat und Succinat während des schnellen Wachstums gebildet wurden, bezogen auf den Umsatz von 1 mol Substrat. Die Säulen stellen die Steigungen der Geraden dar, die durch Auftragung des Substratverbrauchs in verschiedenen Wachstumsintervallen gegen den zugehörigen Anstieg der Produkte und graphische Mittelung der Punkte erhalten wurden (Abb. 17). Die Daten wurden den Abb. 5, 8 und 9 sowie 13, 14 und 15 entnommen. Bildung bzw. Wiederverwertung von Malat bei der Fumaratvergärung wurden in einer entsprechenden Korrektur des Substratumsatzes berücksichtigt.

a - c: Wachstum auf Fumarat, a) mit Formiat, b) ohne Formiat oder Bicarbonat, c) mit Bicarbonat

d - f: Wachstum auf L-Malat, d) mit Formiat, e) ohne Formiat oder Bicarbonat, f) mit Bicarbonat

A = Acetat S = Succinat

Tab. 7 O/R-Bilanzen beim Wachstum mit Fumarat und L-Malat

| | A) Fumarat | | | | | | B) Malat | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Fumarat | Formiat | Succinat | Acetat | $CO_2$ | O/R-Bilanz (%) | Malat | Formiat | Succinat | Acetat | $CO_2$ | O/R-Bilanz (%) |
| O/R-Grad | +2 | +1 | +1 | 0 | +2 | | +2 | +1 | +1 | 0 | +2 | |
| Ohne Bicarbonat und Formiat | | | | | | | | | | | | |
| Konz. (mM) | 100 | - | 65 | 35 | 70 | | 100 | - | 6 | 136 | 97 | |
| O/R x Konz. | 200 | - | 65 | 0 | 140 | 102 | 200 | - | 6 | 0 | 194 | 100 |
| Mit Bicarbonat | | | | | | | | | | | | |
| Konz. (mM) | 100 | - | 63 (40) | 38 (80) | 69 (80) | | 100 | - | 7 | 132 | 96 | |
| O/R x Konz. | 200 | - | 63 (40) | 0 (0) | 138 (160) | 100 (100) | 200 | - | 7 | 0 | 192 | 99 |
| Mit Formiat | | | | | | | | | | | | |
| Konz. (mM) | 100 | 117 | 75 | 25 | 106 | | 100 | 112 | 3 | 157 | 142 | |
| O/R x Konz. | 200 | 117 | 75 | 0 | 212 | 91 | 200 | 112 | 3 | 0 | 284 | 92 |

Die Substrat- und Produktkonzentrationen wurden Tab. 2 und Tab. 6 entnommen.

Definition des O/R-Grades: $(CH_2O)_n$ = 0; 2 (H) zu viel (im Vergleich mit dieser Verbindung) bzw. 1 (O) zu wenig = -1; 2 (H) zu wenig bzw. 1 (O) zu viel = +1.

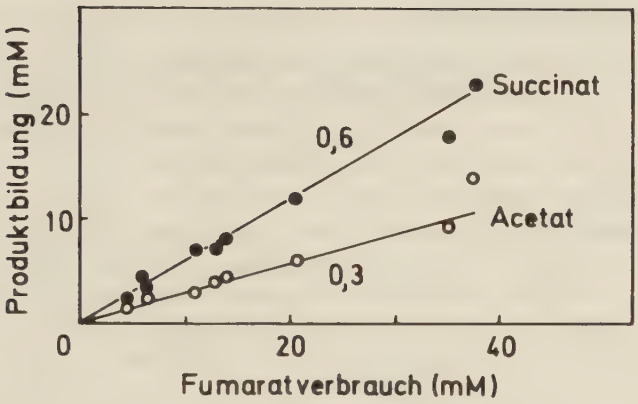



Abb. 17 Produktbildung in Abhängigkeit vom Substratverbrauch beim Wachstum auf Fumarat in Abwesenheit von Bicarbonat und Formiat

Aufgetragen wurde die Bildung von Acetat und Succinat innerhalb unterschiedlich langer Zeiträume gegen den entsprechenden Fumaratverbrauch. Zwischenzeitliche Malatbildung bzw. -wiederverwertung wurde in einer Korrektur des Substratverbrauchs berücksichtigt. Die Werte wurden Abb. 5B entnommen.

## 1.4. Wachstum von C. formicoaceticum auf Fumarat in Kombination mit anderen Substraten

Verschiedene anaerobe Organismen erreichen bei Anzucht in Nährlösungen, die ein als Elektronendonator wirkendes Substrat wie Lactat oder Glycerin sowie Fumarat als Elektronenakzeptor enthalten, hohe Zelldichten, während auf den einzelnen Substraten gar kein oder nur sehr schwaches Wachstum stattfindet. Das weist auf einen mit der Fumaratreduktion gekoppelten energieliefernden Elektronentransport hin. Escherichia coli beispielsweise wächst anaerob sehr gut mit Glycerin und Fumarat (MIKI und LIN, 1973). Gleiches wird von Streptococcus faecalis berichtet (DEIBEL, 1964). Schon QUASTEL et al. (1925) beobachteten bei verschiedenen anaeroben Bakterien sehr gutes Wachstum in Nährlösungen, die Lactat und Fumarat enthielten. Streptococcus faecalis erreicht beim anaeroben Wachstum auf Glucose plus Fumarat die gleichen molaren Ertragskoeffizienten wie bei aerober Glucoseverwertung, während Glucose und Fumarat allein unter anaeroben Bedingungen nur schwaches Wachstum erlauben (DEIBEL und KVETKAS, 1964). Clostridium acetobutylicum vermag mit Fumarat nur in Gegenwart von Glycerin zu wachsen (EGOROV et al., 1972).

### 1.4.1. Wachstum von C. formicoaceticum auf Fumarat und Lactat

C. formicoaceticum wuchs nicht auf Fumarat in Gegenwart von Lactat, wenn die komplexe Nährlösung weder Bicarbonat noch Formiat enthielt. Bei Verwertung von Lactat allein war der Organismus auf Bicarbonat oder Formiat als zusätzliche Elektronenakzeptoren angewiesen.

Sehr gutes Wachstum erfolgte in einem Nährmedium, das neben 100 mM Fumarat und 50 mM Lactat 60 mM $NaHCO_3$ enthielt. Die aus der $OD_{600}$ berechnete Generationszeit betrug 4,5 Stunden.

### 1.4.2. Wachstum auf Fumarat und Fructose

Wie aus Abb. 18 und 19 hervorgeht, wurde Fructose in Gegenwart von Fumarat nur verwertet, wenn die Nährlösung Bicarbonat enthielt; andernfalls wurde nur Fumarat umgesetzt.

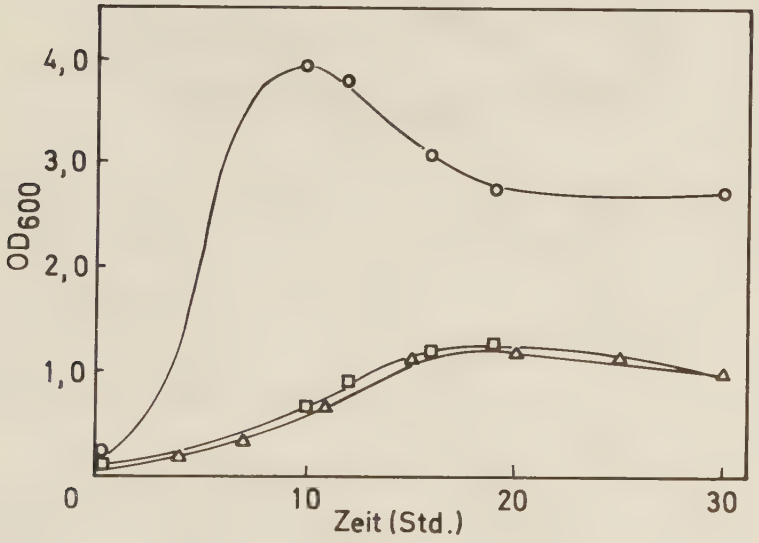



Abb. 18 Wachstum auf Fructose und Fumarat

Die 1 l-Kulturen enthielten in komplexer Nährlösung 22 mM Fructose und 100 mM Fumarat sowie:

o——o 120 mM Bicarbonat, Δ——Δ 120 mM Formiat,

□——□ weder Bicarbonat noch Formiat.

Die OD wurde nach entsprechender Verdünnung bei 600 nm (d = 1 cm) gemessen.

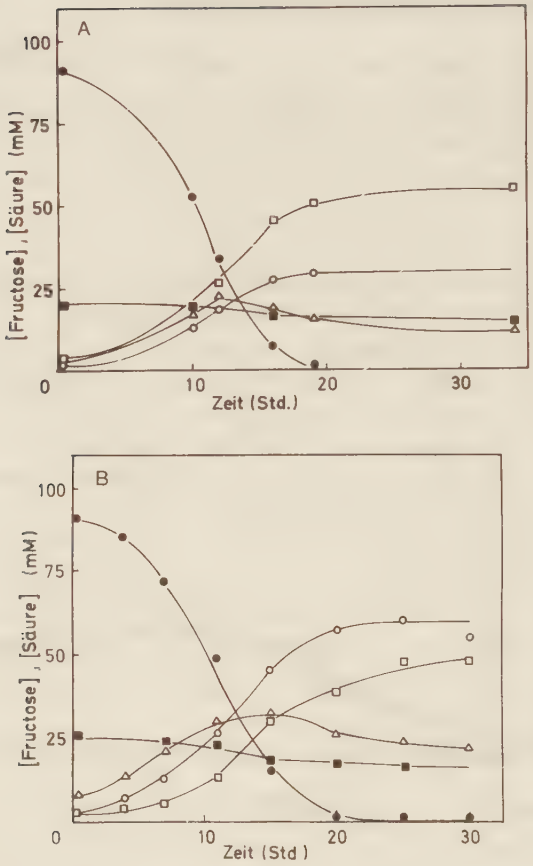



Abb. 19 Substratverbrauch und Säurebildung beim Wachstum in Gegenwart von Fructose und Fumarat

A) in Abwesenheit von Bicarbonat und Formiat,

B) in Gegenwart von 120 mM Formiat.

●———● Fumarat, o———o Acetat, ■———■ Fructose,

□———□ Succinat, △———△ L-Malat.

Bestimmung der angegebenen Substrate bzw. Produkte erfolgte, wie in Methoden beschrieben. Der Trübungsverlauf der genannten Wachstumsversuche ist in Abb. 18 dargestellt.

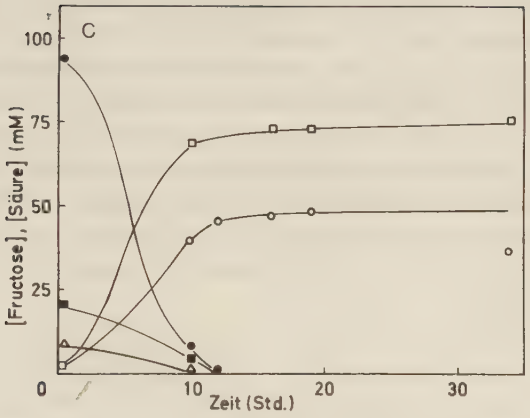



Abb. 19 Substratverbrauch und Säurebildung beim Wachstum in Gegenwart von Fructose und Fumarat

C) in Gegenwart von 120 mM Bicarbonat
●———● Fumarat, O———O Acetat, ■———■ Fructose,
□———□ Succinat, △———△ L-Malat.
Erläuterungen siehe Legende zu Abb. 19A und B.

Die in Abwesenheit von Bicarbonat und Formiat sowie in Gegenwart von Formiat erreichten optischen Dichten ($OD_{600}$ = 1,2; Abb. 18) waren geringer als die mit Fumarat allein unter diesen Bedingungen erzielten Trübungen. Der Zusatz von 120 mM Bicarbonat ermöglichte eine schnelle Verwertung beider Substrate (Abb. 19C). Dabei wurde eine $OD_{600}$ von 4,0 erreicht (Abb. 18). Die Generationszeit betrug 1 - 2 Stunden.

Da sehr viel Succinat (ca. 75 mM) gebildet wurde, reichten die bei der Oxidation des restlichen Fumarats (25 mM) anfallenden Reduktionsäquivalente nicht zur Fumaratreduktion aus. Demnach wurden etwa 25 x [2H] aus dem Fructoseabbau auf Fumarat übertragen. Dagegen war in Zellen, denen nur Fructose als Substrat zur Verfügung stand, diese Reaktion offenbar nicht möglich, da nicht mehr als 1 mM Succinat in der Nährlösung nachzuweisen war.

Unter Bedingungen, die in Gegenwart von Fumarat und Fructose nahezu keinen Abbau des Zuckers zuließen, wurde sehr viel Malat ins Medium ausgeschieden und nur langsam weiter abgebaut (Abb. 19A und B). In Abwesenheit von Bicarbonat und Formiat entsprachen die Konzentrationen der Gärprodukte unter Berücksichtigung des nicht umgesetzten Malats etwa der für Fumaratverwertung aufgestellten Bilanz. In Gegenwart von Formiat wurde mehr Acetat als Succinat gebildet. Formiat muß hierbei entweder zur Fumaratreduktion oder zur Acetatbildung über den Homoacetatweg verwendet worden sein; die Gesamtbilanz ließ keine Differenzierung zwischen den genannten Möglichkeiten zu.

Es ist bemerkenswert, daß Fructose in Gegenwart von Fumarat und Formiat nicht abgebaut wurde, obwohl Fructose allein in formiathaltiger Nährlösung schnell umgesetzt wird.

Beim Wachstum auf Fumarat und Fructose in Abwesenheit von Bicarbonat und Formiat war die Konzentration des durch Fumaratabbau freigesetzten $CO_2$ offenbar nicht ausreichend, die Fructoseverwertung zu stimulieren.

Die Tatsache, daß Bicarbonat in Gegenwart von Fructose die Fumaratverwertung nicht verlangsamte, macht deutlich, daß der beim Wachstum auf Fumarat beobachtete ungünstige Einfluß hoher Bicarbonatkonzentrationen durch weitere Faktoren kontrolliert wird.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen nicht auf einen direkten energieliefernden Elektronentransport zwischen Lactat bzw. Fructose und Fumarat bei C. formicoaceticum schließen. In Gegenwart von Bicarbonat scheint lediglich die gleichzeitige Verwertung zweier Substrate möglich zu sein. Dabei ist natürlich nicht auszuschließen, daß die beim oxidativen Abbau des einen Substrats (Fructose, Lactat) freiwerdenden Reduktionsäquivalente zur Reduktion des zweiten (Fumarat) verwendet werden, um die Redoxbilanz auszugleichen.

## 2. Gärversuche mit ruhenden Zellen

Die Vergärung von Fumarat und Malat sollte unter Bedingungen, die kein Wachstum zuließen, untersucht werden. Aus den zu ermittelnden Gärungsbilanzen sollte eine allgemeine Gärgleichung abgeleitet werden. Anzucht der Zellen erfolgte jeweils auf dem Substrat, das auch im Gärversuch verwendet wurde. Die einzige Ausnahme bildete die Fumaratvergärung durch Zellen, die auf Fructose gewachsen waren.

### 2.1. Vergärung von Fumarat

Eine Zellsuspension von C. formicoaceticum in 57 mM Phosphatpuffer pH 8 mit 1 mM DTE ($OD_{600}$ = 8) setzte unter anaeroben Bedingungen 100 mM Fumarat in Abwesenheit von Bicarbonat und Formiat innerhalb von 2 - 3 Stunden vollständig um. Vorübergehend waren etwa 20 mM L-Malat nachweisbar. Das deutet darauf hin, daß auch unter reinen Gärbedingungen wie beim Wachstum der weitere Umsatz des Malats die Geschwindigkeit der Fumaratdisproportionierung begrenzte.

Die Bestimmung der Gärprodukte ergab in Übereinstimmung mit den Ergebnissen vergleichbarer Wachstumsversuche 66 mM Succinat und 33 mM Acetat pro 100 mM Fumarat (Tab. 8).

Den Verlauf der Fumaratvergärung in Abwesenheit von Bicarbonat und Formiat zeigt Abb. 20. Innerhalb des Versuchszeitraums nahm die Trübung der Zellsuspension auf Grund von Lyse deutlich ab. Die meisten Zellen waren allerdings nach 6 Stunden Inkubation bei 37 °C noch gut beweglich. Da C. formicoaceticum in dünnen Suspensionen schnell lysierte, wurden die optischen Dichten (600 nm) der Gäransätze immer auf Werte über 5,0 eingestellt.

Tab. 8 Substratverbrauch und Produktbildung bei der Vergärung von Fumarat durch ruhende Zellen

| Gärbedingungen | Substratverbrauch (mM) | | Produktbildung (mM) | | | C-Bilanz (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Fumarat | Formiat | Succinat | Acetat | $CO_2$ [1)] | |
| Ohne Bicarbonat und Formiat | 100 | - | 66 | 33 | 66 | 100 |
| 120 mM Bicarbonat | 100 | - | 61<br>(50) | 36<br>(63) | 70<br>(75) | 97<br>(100) |
| 120 mM Formiat | 100 | 85<br>(92) | 69<br>(80) | 45<br>(30) | 100<br>(100) | 96<br>(97) |

Auf Fumarat angezogene, frisch geerntete Zellen wurden in 57 mM K-Phosphatpuffer pH 8, 1 mM DTE unter anaeroben Bedingungen resuspendiert. Die optischen Dichten bei 600 nm lagen nach Zugabe von 100 mM Fumarat zwischen 5 und 9. Inkubation erfolgte bei 37 °C unter $O_2$-freiem Stickstoff. In regelmäßigen Abständen wurden mit einer Spritze 1 ml-Proben entnommen und die Überstände nach Abzentrifugieren der Zellen eingefroren. Die gemessenen Produktkonzentrationen wurden auf 100 mM Fumaratumsatz bezogen. Die Werte in Klammern geben die Ergebnisse eines Parallelversuches wieder. Säurebestimmung siehe Methoden.

[1)] $CO_2$ wurde rechnerisch ermittelt.

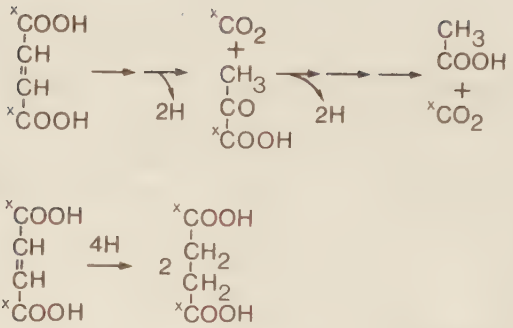
Abb. 20 Vergärung von Fumarat durch ruhende Zellen in Abwesenheit von Bicarbonat und Formiat

2 g frisch geerntete, auf Fumarat angezogene Zellen wurden anaerob in 57 mM K-Phosphatpuffer pH 8, 1 mM DTE, 100 mM Fumarat ad 180 ml resuspendiert. Die OD (600 nm) betrug nach Zugabe des Substrates 5,5. Der Ansatz wurde in einem mit Serumstopfen verschlossenen Erlenmeyerkolben bei 37 °C im Wasserbad unter $O_2$-freiem Stickstoff inkubiert. Mit einer Spritze wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen, in denen die OD (600 nm) sowie nach Abzentrifugieren der Zellen die verschiedenen Säuren bestimmt wurden.

▲———▲ $OD_{600}$, ■———■ L-Malat, □———□ Succinat,
●———● Fumarat, o———o Acetat.

2.1.1. Gärversuch mit 1,4-$^{14}$C-Fumarat

Da Fumarat in Abwesenheit von Bicarbonat zu Succinat, Acetat und $CO_2$ disproportioniert wurde (Tab. 8), war bei Vergärung von 1,4-$^{14}$C-Fumarat zu erwarten, daß nur $CO_2$ und Succinat markiert waren. Es war zu prüfen, ob Acetat dem Schema entsprechend keine Radioaktivität enthielt oder ob auch unter den genannten Gärbedingungen $^{14}CO_2$-Reduktion zu Acetat erfolgte.




Die Vergärung von markiertem Fumarat in anaerob verschlossenen Warburggefäßen ergab eine Bestätigung der für Versuche mit unmarkiertem Fumarat aufgestellten Bilanz. Fumarat wurde innerhalb von 4 Stunden vollständig umgesetzt. Nach dem Austreiben des $CO_2$ wurde im Ansatz noch 66% der eingesetzten Gesamtradioaktivität gemessen (Tab. 9). Das entsprach dem molaren Verhältnis von Succinat zu Fumarat (0,66).

Nach Wasserdampfdestillation des $CO_2$-freien Ansatzes waren im Destillat nur 4% der eingesetzten Radioaktivität nachweisbar. Das bedeutet, daß die wasserdampfflüchtige Essigsäure praktisch unmarkiert war. Bei ausschließlicher Bildung des Acetats durch Pyruvatspaltung war dies zu erwarten. Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase und Acetat-Kinase hatte LINKE (1967) in Extrakten von C. formicoaceticum Stamm El Ghazzawi nachgewiesen. Der Pyruvatabbau in Stamm A1 wurde von ANDREESEN et al. (1974) näher beschrieben. Eine geringe Markierung des Acetats ist möglich, da auch beim Wachstum auf Fumarat die Enzyme des Homoacetatweges vorhanden zu sein scheinen. Durch diese könnte freigesetztes $^{14}CO_2$ zu Acetat reduziert worden sein.

Tab. 9 Vergärung von 1,4-$^{14}$C-Fumarat durch ruhende Zellen

| | Substrat | Produkte | | |
|---|---|---|---|---|
| | Fumarat | Succinat | Acetat | $CO_2$ [1] |
| Konzentration (mM) | 100 | 66 | 32 [2] | 65 |
| Gesamt-cpm | 872 000 | 571 000 | 37 000 | 235 000 |
| cpm (%) | 100 | 66 | 4 | 27 |
| cpm/µmol | 4 360 | 4 330 | 580 | 1 810 |

[1] Die $CO_2$-Konzentration wurde rechnerisch ermittelt.

[2] Acetat wurde vor der Wasserdampfdestillation enzymatisch bestimmt.

Die gemessenen Werte wurden auf 100 mM Substratumsatz bezogen. Die Zellen wurden auf Fumarat angezogen und nach dem Ernten in 57 mM K-Phosphatpuffer pH 8,0 , 1 mM DTE suspendiert. Der Versuch wurde in anaerob verschlossenen zweiarmigen Warburggefäßen bei 37 °C unter $O_2$-freiem Stickstoff durchgeführt. Die Ansätze enthielten:

im Hauptraum: 1,8 ml Zellsuspension ($OD_{600}$ = 13)

im Seitenarm 1: 0,2 ml 1 M Fumarat (0,5 µCi 1,4-$^{14}$C-Fumarat)

im Seitenarm 2: 0,2 ml 4 N $H_3PO_4$

im Zentralzylinder: 0,2 ml 1,8 N KOH (mit Filterpapier).

Vor dem Start mit Substrat wurde 20 Minuten mit $O_2$-freiem Stickstoff begast. Die Ansätze wurden nach 0 bzw. 4 Stunden durch Zukippen der Phosphorsäure abgestoppt. Anschließend wurden die Gefäße zur Überführung des freigesetzten $CO_2$ in Carbonat weitere 60 Minuten geschüttelt. 0,2 ml Carbonatlösung und 0,2 ml-Aliquots des Reaktionsansatzes (nach Abzentrifugieren der Zellen) bzw. des Wasserdampfdestillats wurden in 10 ml Aquasollösung überführt und ausgezählt. Beschreibung der Wasserdampfdestillation und weitere Versuchsbedingungen siehe Methoden.

### 2.1.2. Vergärung von Fumarat durch ruhende Zellen in Gegenwart von Bicarbonat oder Formiat

In Gegenwart von 120 mM Bicarbonat vergoren ruhende Zellen Fumarat etwa nach dem gleichen Muster wie in Abwesenheit von $NaHCO_3$ (Tab. 8). Allerdings war das Produktverhältnis offenbar abhängig

von den Anzuchtsbedingungen und dem physiologischen Zustand der Zellen. So bildeten ohne Bicarbonat angezogene Zellen bei Anwesenheit von 120 mM $NaHCO_3$ im Gäransatz mehr Acetat als Succinat (Tab. 8, Werte in Klammern; Gleichung b , siehe en), während in Gegenwart von Formiat gewachsene Zellen unte sen Bedingungen den durch Gleichung a beschriebenen Gärver.a. zeigten.

Auch die Fumaratvergärung in Gegenwart von 120 mM Formiat führte je nach Anzuchtsbedingungen zu einer unterschiedlichen Zusammensetzung der Gärprodukte (Tab. 8; Gleichungen c , d und e ). Formiat konnte sowohl zur Fumaratreduktion als auch zur Acetatbildung über den Homoacetatweg verwendet werden. Die Reduktion von $CO_2$ zu Acetat benötigt 4 x [2H] pro 2 $CO_2$ (LJUNGDAHL und WOOD, 1969). Die in Gegenwart und Abwesenheit von Bicarbonat beobachteten Umsetzungen lassen sich folgendermaßen formulieren:

a) 6 Fumarat + 4 $H_2O$ ⟶ 4 Succinat + 2 Acetat + 4 $CO_2$

b) 6 Fumarat + 4,5 $H_2O$ ⟶ 3 Succinat + 3,75 Acetat + 4,5 $CO_2$

In Abwesenheit von Bicarbonat verlief die Gärung ausschließlich nach dem in Gleichung a angegebenen Schema. In Gegenwart von Bicarbonat gehorchte der Gärverlauf entweder Gleichung a oder Gleichung b . Bei verminderter Succinatbildung wurden überschüssige Reduktionsäquivalente zur $CO_2$-Reduktion aufgewendet (Gleichung b ).

Die Vergärung von Fumarat bei Zusatz von Formiat ergab ebenfalls unterschiedliche Bilanzen:

c) 6 Fumarat + 4 Formiat + 2 $H_2O$ ⟶ 4 Succinat + 3 Acetat + 6 $CO_2$

In diesem Fall könnte Formiat vollständig zur Fumaratreduktion verwendet worden sein; die gleiche Bilanz ergibt sich jedoch auch, wenn ausschließlich Acetat und $CO_2$ aus Formiat gebildet wurden. Eine Entscheidung zwischen den beiden Möglichkeiten ließ sich nicht treffen. Überschüssige, nicht durch Succinatbildung verbrauchte Reduktionsäquivalente machten in jedem Falle $CO_2$-Re-

duktion zu Acetat zum Ausgleich der Redoxbilanz notwendig.

Andererseits konnten in Gegenwart von Formiat aus 6 molen Fumarat auch mehr als 4 mole Succinat entstehen:

d) 6 Fumarat + 5 Formiat + $H_2O$ ⟶ 5 Succinat + 1,5 Acetat + 6 $CO_2$

Dieser Verlauf ist nur damit zu erklären, daß Fumarat ganz oder zum überwiegenden Teil durch das verfügbare Formiat reduziert wurde. Wurde mehr des angebotenen Formiats umgesetzt als in Gleichung d angegeben, führte dies lediglich zu erhöhter Acetatproduktion:

e) 6 Fumarat + 6 Formiat + 0,5 $H_2O$ ⟶ 5 Succinat + 1,75 Acetat + 6,5 $CO_2$

Die enzymatischen Grundlagen der Fumaratreduktion werden in Kap. 3.1. genauer betrachtet.

## 2.2. Vergärung von L-Malat durch ruhende Zellen

Nicht wachsende Zellen von C. formicoaceticum setzten L-Malat ebenso schnell um wie Fumarat. Die Gärprodukte Succinat und Acetat wurden wie beim Wachstum auf L-Malat in anderen Mengenverhältnissen gebildet als bei Fumaratvergärung (Tab. 10).

Tab. 10 Substratverbrauch und Produktbildung bei der Vergärung von L-Malat durch ruhende Zellen

| Gär-bedingungen | Substrat-verbrauch (mM) | | Produktbildung (mM) | | | C-Bilanz (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | L-Malat | Formiat | Succinat | Acetat | $CO_2$ [1] | |
| Ohne Bicarbonat und Formiat | 100 | - | 15 (35) | 122 (89) | 99 (83) | 100 (100) |
| 120 mM Bicarbonat | 100 | - | 37 | 85 | 82 | 100 |
| 120 mM Formiat | 100 | 218 [2] | 45 | 130 | 187 | 101 |

[1] Die $CO_2$-Konzentration wurde rechnerisch ermittelt.

[2] Die gemessene Formiatabnahme wurde ebenfalls auf 100 mM Malatverbrauch umgerechnet.

Die Anfangs-OD (600 nm) der Ansätze lag zwischen 5 und 12. Der Gärpuffer enthielt 100 mM L-Malat. Einzelheiten zur Versuchsdurchführung und zu den Säurebestimmungen siehe Legende zu Tab. 8 und Methoden. Nach Bestimmung der Gärprodukte wurden deren Konzentrationen auf 100 mM Malatumsatz umgerechnet.

2.2.1. Vergärung von L-Malat ohne Bicarbonatzusatz sowie in Gegenwart von Bicarbonat oder Formiat

Wie aus Tab. 10 hervorgeht, stellte Acetat auch bei der Vergärung von Malat durch ruhende Zellen das Hauptgärprodukt dar. Während jedoch beim Wachstum nur 2 - 7 mM Succinat pro 100 mM Substratverbrauch nachgewiesen wurden, betrug der Anteil dieses Produkts unter Gärbedingungen 15 - 45 mM.

Fumarat wurde als Zwischenprodukt nicht angehäuft, was auf schnelle Reduktion schließen läßt. In Abwesenheit von Bicarbonat und Formiat variierte der Gärverlauf je nach Zustand der eingesetzten Zellen (Tab. 10). Bei Bildung von nur 15 mM Succinat mußte entsprechend mehr Acetat entstehen als bei Ausscheidung von 35 mM Succinat. Die Bilanzen für diese beiden Möglichkeiten der Gärung

sind wie folgt zu formulieren:

f) 6 Malat ⟶ 1 Succinat + 7,25 Acetat + 5,5 $CO_2$ + 0,5 $H_2O$

g) 6 Malat ⟶ 2 Succinat + 5,5 Acetat + 5 $CO_2$ + $H_2O$

Auch die Vergärung von L-Malat in Gegenwart von 120 mM Bicarbonat (Tab. 10) ergab ein Gleichung g entsprechendes Produktverhältnis. Enthielt der Gärpuffer 120 mM Formiat, war die Bildung von Succinat begünstigt:

h) 6 Malat + 13 Formiat ⟶ 3 Succinat + 7 Acetat + 11 $CO_2$ + 8 $H_2O$

Alle aufgeführten Beispiele zeigen, daß an der Vergärung von L-Malat durch ruhende Zellen immer der Homoacetatweg zum Ausgleich der Redoxbilanz beteiligt sein mußte. Außerdem wird deutlich, daß unter günstigen Bedingungen fast so viel Succinat entstehen konnte wie bei der Vergärung von Fumarat. Hingegen schien beim Wachstum auf Malat das an der Fumaratreduktion beteiligte Enzymsystem keine wichtige Funktion zu erfüllen.

## 2.3. Vergärung von Fumarat durch ruhende Zellen nach Anzucht auf Fructose

Obwohl C. formicoaceticum beim Wachstum auf Fructose praktisch kein Succinat bildete (1 mM pro 22 mM Fructoseverbrauch), waren die Zellen in der Lage, Fumarat langsam zu vergären. Vollständige Umsetzung des Substrats dauerte auch bei einer Anfangs-OD (600 nm) von 16 etwa 24 Stunden; in diesem Zeitraum nahm die Trübung jedoch um 50% ab.

Tab. 11 zeigt die Ergebnisse. Bei Versuchsende war Fumarat vollständig verbraucht, aber die Ansätze ohne bzw. mit 120 mM Bicarbonat enthielten noch eine größere Menge L-Malat, das praktisch nicht weiter umgesetzt wurde. Nur in Gegenwart von Formiat war zu diesem Zeitpunkt kein Malat mehr nachweisbar.

Tab. 11 Vergärung von Fumarat durch ruhende Zellen nach Anzucht auf Fructose

| Gärbedingungen | Fumarat-verbrauch (mM) | Produktbildung (mM) Succinat | Acetat | Malat |
|---|---|---|---|---|
| Ohne Bicarbonat und Formiat | 100 | 32 | 27 | 43 |
| 120 mM Bicarbonat | 100 | 31 | 21 | 48 |
| 120 mM Formiat | 100 | 55 | 63 | 0 |

Formiatverbrauch und $CO_2$-Bildung wurden nicht berücksichtigt. Je 0,5 g Zellen wurden in 57 mM K-Phosphatpuffer pH 8,0 , 1 mM DTE mit 100 mM Fumarat und den angegebenen Zusätzen ad 10 ml suspendiert ($OD_{600}$ = 16 - 19). Inkubation erfolgte bei 37 °C unter $O_2$-freiem Stickstoff. In Abständen von 1 - 2 Stunden wurden 1 ml-Proben entnommen, zentrifugiert und eingefroren. Die gemessenen Produktkonzentrationen wurden auf 100 mM Fumaratverbrauch bezogen.

Eine Berechnung der Bilanzen nach Abzug des Malats ergab für die Gärung mit bzw. ohne Bicarbonat 56 - 60 mM Succinat und 40 - 47 mM Acetat pro 100 mM Fumaratverbrauch. Formiat im Gäransatz veränderte die Succinatmenge nicht, führte jedoch zu erhöhter Acetatproduktion (Tab. 11).

Der Versuch zeigt, daß C. formicoaceticum sowohl nach Anzucht auf Fumarat als auch auf Fructose bei Fumaratvergärung die Produkte im gleichen Verhältnis bildete. Auf Fructose gewachsene Zellen lysierten jedoch im Verlauf der Gärung. Sie schienen demnach den Energiebedarf des Erhaltungsstoffwechsels mit Fumarat als Substrat nicht decken zu können. Die Anhäufung von Malat deutet darauf hin, daß die Zellen nach Wachstum auf Fructose die $C_4$-Dicarbonsäuren nur sehr langsam aufzunehmen und in den Intermediärstoffwechsel einzuschleusen vermochten. Dies könnte z.B. durch eine niedrige Aktivität des Malat-Enzyms bedingt sein (siehe Kap. 3.3.). Der schnelle Abbau von zwischenzeitlich gebildetem Malat in Gegenwart von Formiat läßt jedoch vermuten, daß noch

andere Faktoren die Umsatzrate der $C_4$-Dicarbonsäuren beeinflußten.

## 2.4. Aufstellung einer allgemeinen Gärgleichung

Aus den in Kap. 2.1.2. und 2.2.2. aufgestellten speziellen Umsatzgleichungen ließen sich allgemeine Gärgleichungen für die Fumarat- und Malatvergärung herleiten.

### 2.4.1. Allgemeine Gleichung für die Vergärung von Fumarat

Aus den einfachen Gleichungen a und b (Kap. 2.1.2.) ergibt sich folgende allgemeine Formulierung:

$$a\,\text{Fumarat} + x\,[2H] \longrightarrow x\,\text{Succinat} + (a-x)\,\text{Fumarat}$$

$$(a-x)\,\text{Fumarat} + 2\,(a-x)\,H_2O \longrightarrow (a-x)\,\text{Acetat} + 2\,(a-x)\,[2H] + 2\,(a-x)\,CO_2$$

Summe:

$$(A)\quad a\,\text{Fumarat} + 2\,(a-x)\,H_2O \longrightarrow x\,\text{Succinat} + (a-x)\,\text{Acetat} + (2a-3x)\,[2H] + 2\,(a-x)\,CO_2$$

a und x bezeichnen die molaren Mengen Fumarat bzw. Succinat. Wenn $x = \frac{2}{3}a$, werden die Reduktionsäquivalente vollständig zur Succinatbildung verwendet. $x > \frac{2}{3}a$ wurde in Abwesenheit von Formiat nicht beobachtet. Ist jedoch $x < \frac{2}{3}a$, müssen überschüssige $[2H]$ durch $CO_2$-Reduktion zu Acetat verbraucht werden (Homoacetatweg):

$$(2a-3x)\,[2H] + \tfrac{1}{2}\,(2a-3x)\,CO_2 \longrightarrow \tfrac{1}{4}\,(2a-3x)\,\text{Acetat} + \tfrac{1}{2}\,(2a-3x)\,H_2O$$

Nach Zusammenfassung mit Gleichung (A) erhält man:

$$(B)\quad a\,\text{Fumarat} + (a-\tfrac{1}{2}x)\,H_2O \longrightarrow x\,\text{Succinat} + \tfrac{1}{4}\,(6a-7x)\,\text{Acetat} + \tfrac{1}{2}\,(2a-x)\,CO_2$$

Gleichung ( B ) besitzt Gültigkeit für $x \leq \frac{2}{3} a$ . $x = 0$, das heißt vollständige Vergärung von Fumarat zu Acetat und $CO_2$ wurde nicht beobachtet.

In Anwesenheit von Formiat in der Nährlösung und im Gärpuffer wurde mehr Succinat oder mehr Acetat bzw. beides in höherer Konzentration gebildet. Es gilt folgende Beziehung mit Fumarat (a), Formiat (b) und Succinat (x) als in gewissen Grenzen variablen Größen:

$$a \text{ Fumarat} + x\ [2H] \longrightarrow x \text{ Succinat} + (a - x) \text{ Fumarat}$$

$$(a - x) \text{ Fumarat} + 2\,(a - x)\, H_2O \longrightarrow (a - x) \text{ Acetat} + 2\,(a - x)\ [2H] + 2\,(a - x)\, CO_2$$

$$b \text{ Formiat} \longrightarrow b\, CO_2 + b\ [2H]$$

---

$$a \text{ Fumarat} + 2\,(a - x)\, H_2O + b \text{ Formiat} \longrightarrow x \text{ Succinat} + (a - x) \text{ Acetat} + (2a - 2x + b)\, CO_2 + (2a - 3x + b)\ [2H]$$

$$(2a - 3x + b)\ [2H] + \tfrac{1}{2}(2a - 3x + b)\, CO_2 \longrightarrow \tfrac{1}{4}(2a - 3x + b) \text{ Acetat} + \tfrac{1}{2}(2a - 3x + b)\, H_2O$$

---

Summe:

$$(C)\quad a \text{ Fumarat} + b \text{ Formiat} + \tfrac{1}{2}(2a - x - b)\, H_2O \longrightarrow x \text{ Succinat} + \tfrac{1}{4}(6a - 7x + b) \text{ Acetat} + \tfrac{1}{2}(2a - x + b)\, CO_2$$

Eine Vereinfachung dieser Gleichung ergibt sich, wenn $x = b \neq 0$, das heißt,wenn genau so viel Succinat gebildet wie Formiat verbraucht wird (vgl. Gleichung c und d , Kap. 2.1.2.):

$$(D)\quad a \text{ Fumarat} + (a - x)\, H_2O + x \text{ Formiat} \longrightarrow x \text{ Succinat} + \tfrac{3}{2}(a - x) \text{ Acetat} + a\, CO_2$$

Es sei hier betont, daß diese Gleichung nichts über den Verlauf der Gärung aussagt, folglich keinen Schluß auf die genaue Herkunft der auf Fumarat bzw. $CO_2$ übertragenen Reduktionsäquivalente in vivo zuläßt. Aus diesem Grunde wurde auch die Oxidation von Formiat zu $CO_2$ als unabhängig ablaufende Reaktion formuliert.

Für den Fall, daß äquimolare Mengen Formiat umgesetzt und Succinat gebildet wurden, konnte als Höchstwert $x = \frac{5}{6}\,a$ beobachtet werden. Eine vollständige Reduktion von Fumarat durch Formiat wurde nicht gefunden.

Aus Gleichung ( C ) ist zu ersehen, daß bei $b > x$ zum Ausgleich der Redoxbilanz vermehrt Acetat ausgeschieden werden muß. Ein Vergleich der Umsetzungen e und f (Kap. 2.1.2.) bestätigt dies. Bei Vergärung von 100 mM Fumarat in Gegenwart von 120 mM Formiat wurde immer mindestens so viel Formiat umgesetzt, wie Succinat gebildet wurde.

## 2.4.2. Allgemeine Gleichung für die Vergärung von L-Malat

Da sich Fumarat und L-Malat in der Oxidationsstufe nicht unterscheiden und identische Gärprodukte nachgewiesen wurden, waren keine qualitativen Unterschiede in den Gärgleichungen für die beiden Säuren zu erwarten. Hingegen wichen die Mengenverhältnisse der Endprodukte bei Vergärung von Fumarat und Malat deutlich voneinander ab.

Die Gleichungen f und g (Kap. 2.2.1.) lassen sich durch die folgenden Formulierungen allgemeiner fassen:

$$a\ \text{Malat} + x\ [2H] \longrightarrow x\ \text{Succinat} + (a-x)\ \text{Malat} + x\ H_2O$$

$$(a-x)\ \text{Malat} + (a-x)\ H_2O \longrightarrow (a-x)\ \text{Acetat} + 2\,(a-x)\ [2H] + 2\,(a-x)\ CO_2$$

---

$$a\ \text{Malat} + (a-2x)\ H_2O \longrightarrow x\ \text{Succinat} + (a-x)\ \text{Acetat} + (2a-3x)\ [2H] + 2\,(a-x)\ CO_2$$

$$(2a-3x)\ [2H] + \tfrac{1}{2}\,(2a-3x)\ CO_2 \longrightarrow \tfrac{1}{4}\,(2a-3x)\ \text{Acetat} + \tfrac{1}{2}\,(2a-3x)\ H_2O$$

---

Summe:

$$\text{( E )}\quad a\ \text{Malat} \longrightarrow x\ \text{Succinat} + \tfrac{1}{4}\,(6a-7x)\ \text{Acetat} + \tfrac{1}{2}\,(2a-x)\ CO_2 + \tfrac{1}{2}\,x\ H_2O$$

Bei Vergärung von L-Malat durch ruhende Zellen in Abwesenheit von Formiat wurde im allgemeinen etwa $\frac{1}{3}$ (also $x = \frac{a}{3}$), jedoch immer weniger als die Hälfte (also $x < \frac{a}{2}$) des eingesetzten Malats zu Succinat umgesetzt (Gleichung g ; Kap. 2.2.1.). Ein vollständiger Verbrauch der verfügbaren Reduktionsäquivalente durch Fumaratreduktion fand nicht statt. Beim Wachstum mit Malat wurde nur wenig Succinat gebildet; es galt etwa $x < \frac{a}{10}$ . Die Redoxbilanz wurde durch Homoacetatgärung ausgeglichen. Vollständiger Umsatz von Malat zu Acetat war jedoch nicht zu beobachten.

In Gegenwart von Formiat bildeten ruhende Zellen höchstens 3 mole Succinat/6 mole Malat, entsprechend $x = \frac{a}{2}$ . Daraus ließ sich die folgende Gärgleichung ableiten:

$$a\ \text{Malat} + x\ [2H] \longrightarrow x\ \text{Succinat} + (a-x)\ \text{Malat} + x\ H_2O$$

$$(a-x)\ \text{Malat} + (a-x)\ H_2O \longrightarrow (a-x)\ \text{Acetat} + 2\ (a-x)\ [2H] + 2\ (a-x)\ CO_2$$

$$b\ \text{Formiat} \longrightarrow b\ [2H] + b\ CO_2$$

---

$$a\ \text{Malat} + b\ \text{Formiat} + (a-2x)\ H_2O \longrightarrow x\ \text{Succinat} + (a-x)\ \text{Acetat} + (2a-2x+b)\ CO_2 + (2a-3x+b)\ [2H]$$

$$(2a-3x+b)\ [2H] + \tfrac{1}{2}\ (2a-3x+b)\ CO_2 \longrightarrow \tfrac{1}{4}\ (2a-3x+b)\ \text{Acetat} + \tfrac{1}{2}\ (2a-3x+b)\ H_2O$$

---

Summe:

$$(F)\quad a\ \text{Malat} + b\ \text{Formiat} \longrightarrow x\ \text{Succinat} + \tfrac{1}{4}\ (6a-7x+b)\ \text{Acetat} + \tfrac{1}{2}\ (2a-x+b)\ CO_2 + \tfrac{1}{2}\ (x+b)\ H_2O$$

Im Gegensatz zur Vergärung von Fumarat wurde der Grenzfall b = x (Formiatverbrauch = Succinatbildung) hier nicht beobachtet. Demnach galt in Gegenwart ausreichender Mengen Formiat unter den beschriebenen Versuchsbedingungen für Malatvergärung immer b x.

Wie Gleichung h (Kap. 2.2.1.) zeigt, vermochten ruhende Zellen mehr als zweimal so viel Formiat wie Malat umzusetzen. Dies schien nahezu unabhängig von der Malatvergärung abzulaufen und

führte zu einem starken Anstieg der Acetatkonzentration, während Succinat nur geringfügig zunahm.

2.5. Zusammenfassung der Gärversuche mit ruhenden Zellen

a) Unter Bedingungen, die kein Wachstum zuließen, vergoren Zellen von C. formicoaceticum Fumarat und L-Malat zu Succinat, Acetat und $CO_2$.

Bei Vergärung von Fumarat wurden Succinat und Acetat im allgemeinen im Verhältnis 2 : 1 gebildet, während bei Umsetzung von L-Malat Acetat überwog. Abb. 21 soll diesen Unterschied noch einmal verdeutlichen. Es wurde die graphisch ermittelte Beziehung zwischen Produktbildung und Substratverbrauch im Verlauf der Gärung aufgetragen (vgl. Abb. 17). Ein Vergleich mit Abb. 16 zeigt, daß die Vergärung von Fumarat durch wachsende und ruhende Zellen zu annähernd gleichen Mengenverhältnissen der Gärprodukte führte; dagegen wurde aus L-Malat unter reinen Gärbedingungen mindestens doppelt so viel Succinat gebildet wie beim Wachstum.

Vollständige Umsetzung von Fumarat bzw. L-Malat zu Acetat und $CO_2$ als einzigen Produkten wurde nicht beobachtet.

b) Die C-Bilanzen lagen unter Berücksichtigung des indirekt aus den Säurekonzentrationen bestimmbaren $CO_2$ nahe bei 100% (Tab. 8, 10). Auch die O/R-Bilanzen waren ausgeglichen (Tab. 12). Andere als die genannten Gärprodukte wurden nicht nachgewiesen.

Tab. 12 O/R-Bilanzen bei der Vergärung von Fumarat und L-Malat durch ruhende Zellen

| | A) Fumarat | | | | | | B) Malat | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Fumarat | Formiat | Succinat | Acetat | $CO_2$ | O/R-Bilanz (%) | Malat | Formiat | Succinat | Acetat | $CO_2$ | O/R-Bilanz (%) |
| O/R-Grad | +2 | +1 | +1 | 0 | +2 | | +2 | +1 | +1 | 0 | +2 | |
| Ohne Bicarbonat und Formiat | | | | | | | | | | | | |
| Konz. (mM) | 100 | - | 66 | 33 | 66 | | 100 | - | 15 | 122 | 99 | |
| O/R x Konz. | 200 | - | 66 | 0 | 132 | 99 | 200 | - | 15 | 0 | 198 | 106 |
| Mit Bicarbonat | | | | | | | | | | | | |
| Konz. (mM) | 100 | - | 61 | 36 | 70 | | 100 | - | 37 | 85 | 82 | |
| O/R x Konz. | 200 | - | 61 | 0 | 140 | 100 | 200 | - | 37 | 0 | 164 | 100 |
| Mit Formiat | | | | | | | | | | | | |
| Konz. (mM) | 100 | 85 | 69 | 45 | 100 | | 100 | 218 | 45 | 130 | 187 | |
| O/R x Konz. | 200 | 85 | 69 | 0 | 200 | 95 | 200 | 218 | 45 | 0 | 374 | 100 |

Die Substrat- und Produktkonzentrationen wurden Tab. 8 und 10 entnommen. Definition des O/R-Grades siehe Legende zu Tab. 7.

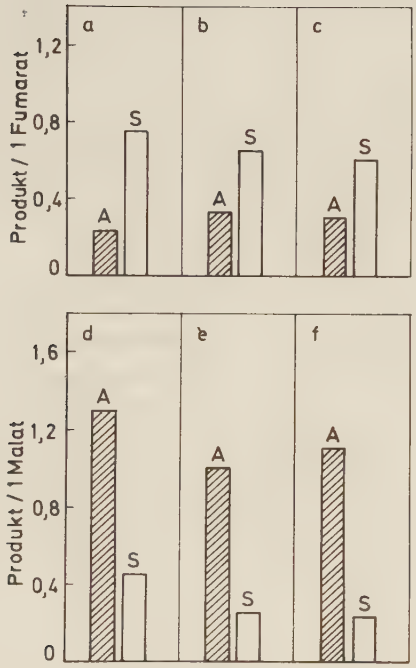



Abb. 21 Verhältnis von Succinat- und Acetatbildung zum Substratverbrauch während der Vergärung von Fumarat und L-Malat durch ruhende Zellen

Das Diagramm gibt an, wieviel Acetat ( A ) und Succinat ( S ) während der Gärung pro 1 mol Substrat gebildet wurden. Die Höhe der Säulen entspricht den Steigungen der Geraden, die sich durch Auftragung des Substratumsatzes während verschiedener Zeiträume gegen den zugehörigen Anstieg der Produkte und graphische Mittelung der Punkte ergaben (vgl. Abb. 17). Bei Vergärung von Fumarat wurden Bildung bzw. Wiederverwertung von L-Malat in einer Korrektur des Substratverbrauchs berücksichtigt.

c) Aus den experimentell ermittelten Umsatzgleichungen für Fumarat und L-Malat konnten allgemeine Gärgleichungen abgeleitet werden, die sich nur in der Beteiligung von Wasser unterschieden. Für die variablen Größen a (Fumarat- bzw. Malatverbrauch), b (Formiatumsatz) und x (Succinatbildung) gibt es jedoch Grenzwerte, die in Abhängigkeit davon, ob Fumarat oder L-Malat vergoren werden, verschieden sind.

$$(C)\quad a\,\text{Fumarat} + b\,\text{Formiat} + \tfrac{1}{2}(2a - x - b)\,H_2O \longrightarrow x\,\text{Succinat} + \tfrac{1}{4}(6a - 7x + b)\,\text{Acetat} + \tfrac{1}{2}(2a - x + b)\,CO_2$$

Die Gleichung ist gültig für $x \leq \frac{5}{6}a$ in Gegenwart von Formiat. $x < \frac{2}{3}a$ wurde in diesem Falle nicht beobachtet. In Abwesenheit von Formiat gilt höchstens $x \leq \frac{2}{3}a$. Enthielt der Gäransatz neben Fumarat (100 mM) Formiat (120 mM), wurde niemals weniger Formiat verbraucht als Succinat gebildet. Vielfach wurde ebensoviel Formiat umgesetzt wie Fumarat zu Succinat reduziert, das heißt es gilt $b \geq x$. Da immer $x \geq \frac{2}{3}a$ in Gegenwart von Formiat, ist außerdem gültig $b \geq \frac{2}{3}a$. Auch wenn $b > \frac{5}{6}a$ oder $b = a$, überstieg die Succinatproduktion nie $x = \frac{5}{6}a$, so daß überschüssiges Formiat zu Acetat und $CO_2$ disproportioniert wurde.

$$(F)\quad a\,\text{Malat} + b\,\text{Formiat} \longrightarrow x\,\text{Succinat} + \tfrac{1}{4}(6a - 7x + b)\,\text{Acetat} + \tfrac{1}{2}(2a - x + b)\,CO_2 + \tfrac{1}{2}(x + b)\,H_2O$$

Die Gleichung gilt für $x = \frac{a}{2}$ in Gegenwart von Formiat und $x < \frac{a}{2}$ in Abwesenheit von Formiat. Bei Einsatz der unter Wachstumsbedingungen optimalen Formiatkonzentration (120 mM) war der Formiatumsatz immer wesentlich höher als die Succinatbildung, das heißt $b > x$. Außerdem war im allgemeinen auch $b > a$, was in jedem Falle zusätzliche Acetatbildung aus Formiat erforderlich machte.

d) Bei der Vergärung von Fumarat durch ruhende Zellen wurde vorübergehend mehr L-Malat gebildet als beim Wachstum. Mit Fructose gewachsene Zellen setzten im Verlauf der Fumaratvergärung über 50% des Substrats lediglich zu Malat um, das nur langsam weiter abgebaut werden konnte.

## 3. Nachweis der am $C_4$-Dicarbonsäure-Stoffwechsel beteiligten Enzyme in Rohextrakten

Die Wachstums- und Gärversuche mit C. formicoaceticum hatten gezeigt, daß aus Fumarat und L-Malat Succinat und Acetat gebildet wurden. In Rohextrakten sollten die an der $C_4$-Dicarbonsäure-Vergärung beteiligten Enzyme nachgewiesen werden. Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase und Phosphotransacetylase wurden von LINKE (1969b) in Extrakten von C. formicoaceticum untersucht. Die Anwesenheit aller an der Essigsäuresynthese aus $CO_2$ beteiligten Enzyme bestätigten O'BRIEN und LJUNGDAHL (1972).

### 3.1. Fumarat-Reduktase

Eine Fumarat-Reduktase, die die Reaktion

$$\text{Fumarat} + [2H] \longrightarrow \text{Succinat}$$

katalysiert, konnte in Rohextrakten von C. formicoaceticum nachgewiesen werden.

#### 3.1.1. Optimierung der Testbedingungen

Die Bestimmung der Fumarat-Reduktase-Aktivität erfolgte mittels eines manometrischen Tests nach BERNATH und SINGER (1962) in Gegenwart von $H_2$, 50 mM Fumarat, 7,5 mM FMN bzw. 10 mM Methylviologen (HAUBER und SINGER, 1967) sowie einem Überschuß von Rohextrakt aus C. pasteurianum, das eine aktive Hydrogenase, aber keine Fumarat-Reduktase enthält (PECK et al., 1957). Der Wasserstoffverbrauch verlief bis zu einem Umsatz von mehr als 100 µl in 10 Minuten noch linear und extraktproportional.

In Abwesenheit von Fumarat bzw. Hydrogenase oder Rohextrakt aus C. formicoaceticum war keine Aktivität vorhanden. Ohne FMN oder MV wurde gelegentlich ein geringer $H_2$-Verbrauch gemessen (0,07 bis 0,09 µmole/min·mg Protein). Er dürfte darauf beruhen, daß die im Extrakt von C. formicoaceticum in hoher Konzentration enthaltenen Flavine Wasserstoffübertragung auf Fumarat ermöglichten.

Einen Vergleich der Enzymaktivitäten mit FMN und MV zeigt Tab. 13. MV erwies sich als der günstigere Elektronendonator für die Fumarat-Reduktase.

Tab. 13 Vergleich der spezifischen Aktivitäten der Fumarat-Reduktase mit FMN und MV

| Elektronendonator | Spezifische Aktivität (E/mg) im Rohextrakt |
|---|---|
| $FMNH_2$ | 0,16 - 0,19 |
| $MV_{red.}$ | 3,50 - 3,80 |

Der Extrakt wurde durch Aufschluß eingefrorener Zellen mit der French-Presse und anschließende Zentrifugation bei 50 000 x g (40 Minuten) hergestellt. Der Proteingehalt des klaren Überstandes betrug 20 mg/ml. Die Warburggefäße enthielten

im Hauptraum: 52 mM K-Phosphat-Puffer pH 7,6, 50 mM Fumarat, 7,5 mM FMN bzw. 10 mM MV und $H_2O$ ad 2 ml Gesamtvolumen
im Seitenarm 1: 0,2 ml C. pasteurianum-Extrakt (Hydrogenase)
im Seitenarm 2: 0,1 - 0,2 ml Extrakt von C. formicoaceticum (0,2 - 0,4 mg Protein)

Vor Zugabe der Hydrogenase zur Reaktionsmischung wurden die Gefäße 5 Minuten unter $H_2$ bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde weitere 5 Minuten begast. Nach dem Schließen der Hähne wurden die Ansätze 15 Minuten äquilibriert. Die Reaktion wurde durch Einkippen des Extrakts in den Hauptraum gestartet. Der $H_2$-Verbrauch wurde in Abständen von 5 Minuten abgelesen (Versuchsdauer 40 bis 60 Minuten). Einzelheiten zur Extraktherstellung und zu den manometrischen Messungen siehe Methoden.

Das niedrige Redoxpotential von MV ($E_o'$ = -0,446 V) verglichen mit dem von FMN ($E_o'$ = 0,219 V) könnte ein Grund für die höhere Aktivität des Enzyms mit dem unphysiologischen Elektronendonator sein. Möglicherweise besitzt der in vivo an der Fumaratreduktion beteiligte Elektronenüberträger ein ähnlich negatives Potential.

Die NADP-abhängige Formiat-Dehydrogenase aus C. thermoaceticum zeigt ebenfalls mit MV eine höhere Aktivität als mit NADP (ANDREESEN und LJUNGDAHL, 1974).

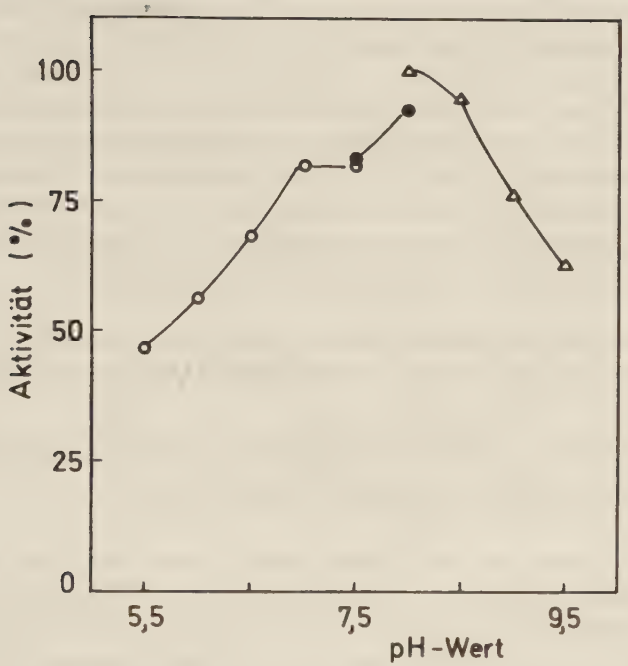



Abb. 22 pH-Abhängigkeit der Fumarat-Reduktase-Aktivität

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurden folgende Puffer eingesetz:

pH 5,5 - 7,5 K-Phosphat

pH 7,5 - 8,0 HEPES-KOH

pH 8,0 - 9,5 Diäthanolamin(DEA)-HCl

Die Endkonzentration betrug jeweils 50 mM. Die manometrischen Messungen wurden mit MV als Elektronenüberträger durchgeführt (siehe Legende zu Tab. 13 und Methoden). Als Extrakt diente ein Sphäroplastenüberstand (EI) nach Lysozymbehandlung in Gegenwart von Saccharose (siehe Methoden). Die maximal erreichte Aktivität (bei pH 8,0) wurde gleich 100% gesetzt.

SCHNEIDER (1975) beobachtete mit künstlichen H-Akzeptoren eine höhere Aktivität der NAD-gekoppelten Hydrogenase aus Alcaligenes eutrophus H 16 als mit NAD.

Mit Benzylviologen verlief die Reaktion nur bei sehr niedrigen Proteinkonzentrationen linear. Außerdem war ohne Fumarat eine deutliche Blindreaktion zu verzeichnen.

Die Bestimmung der Fumarat-Reduktase-Aktivität mit MV in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,6 ergab keinen Unterschied zu den in Phosphatpuffer gemessenen Werten. Ein nicht aufgetrennter Rohextrakt von Zellen nach Anzucht auf Fumarat zeigte in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,6) eine spezifische Aktivität von 0,77 E/mg Protein, in 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,6) 0,81 E/mg Protein.

Das pH-Optimum der im manometrischen Test mit MV bestimmten Fumarat-Reduktase-Aktivität lag zwischen pH 7,5 und pH 8,5 (Abb.22).

### 3.1.2. Vergleich der Fumarat-Reduktase-Aktivitäten in Rohextrakten nach verschiedenen Zellaufschlußverfahren

Aufschluß von Zellen mit der French-Presse ergab eine etwa gleiche prozentuale Verteilung der Fumarat-Reduktase-Aktivität zwischen Überstand und Pellet nach Zentrifugation bei 50 000 x g . Wurde dagegen eine Zellsuspension in anaerobem Phosphatpuffer (pH 7,6) mehrere Stunden in Gegenwart von 1 mg Lysozym/ml bei Raumtemperatur inkubiert, war nach Zentrifugation des Extraktes die Aktivität im Pellet höher als im Überstand. Das war ein erster Hinweis darauf, daß die Fumarat-Reduktase zumindest locker mit den Membranen assoziiert sein könnte, durch grobe Zellaufschluß-Verfahren jedoch leicht abgelöst wurde.

Zur Klärung dieser Frage wurden Zellen in einem Puffer hoher Ionenstärke (300 mM K-Phosphat, pH 7,6) mit Lysozym inkubiert. Hohe Ionenstärken verhindern z.B. die Ablösung der ATPase von Micrococcus lysodeikticus von den Membranen (MUÑOZ et al., 1968; LASTRAS und MUÑOZ, 1974). Da Lysozym bei dem angewandten pH-Wert nicht optimal wirksam ist, wurden die Ansätze 3 Stunden bei 37 $^{o}$C unter $N_2$ inkubiert. Es trat jedoch keine Lyse ein, sondern die Zellen rundeten sich zu Sphäroplasten ab. Halbstündige Zentrifugation bei 50 000 x g lieferte einen blaßgelben Überstand (EI).

Die Sphäroplasten wurden im doppelten Volumen 0,15 M K-Phosphatpuffer pH 7,6 suspendiert, mit DNase versetzt und bis zur vollständigen Lyse anaerob bei Raumtemperatur stehengelassen. Der Extrakt wurde durch Zentrifugation in einen klaren, gelblichbraunen Überstand (EII) und das Pellet (PII) aufgetrennt. Tab. 14 gibt die Verteilung der Fumarat-Reduktase in den genannten Fraktionen an.

Tab. 14 Verteilung der Fumarat-Reduktase-Aktivität in den Fraktionen nach Lysozymaufschluß in Phosphatpuffer

| Extraktfraktion | Gesamtaktivität (E) | Spezif. Aktivität (E/mg Protein) |
|---|---|---|
| EI | 68 (44%) | 2,6 |
| EII | 9,7 ( 6%) | 0,1 |
| PII | 78 (50%) | 1,3 |

Einzelheiten zur Extraktherstellung siehe Text und Methoden. Testansatz siehe Legende zu Tab. 13. Als Elektronenüberträger wurde FMN eingesetzt. 0,1 - 0,2 ml der verdünnten Extraktfraktionen enthielten 0,05 - 0,22 mg Protein.
EI = Sphäroplastenüberstand, EII = lösliche Fraktion des Extraktes (50 000 x g ), PII = Pellet nach 50 000 x g -Zentrifugation.

Die hohe Ionenstärke des Puffers verhinderte offenbar die sofortige Lyse der unter Lysozymeinwirkung entstandenen Sphäroplasten. Da nicht entschieden werden konnte, ob diese ovalen oder abgerundeten Gebilde noch Reste des Mureingerüsts enthielten oder nicht, sollen sie weiterhin als Sphäroplasten und nicht als Protoplasten bezeichnet werden.

Durch Plasmolyse und Lysozymeinwirkung wurden schon 44% der Gesamtaktivität der Fumarat-Reduktase freigesetzt. Von den drei Fraktionen wies der Sphäroplastenüberstand (EI) mit 2,6 E/mg Protein die höchste spezifische Aktivität des Enzyms auf. Der Extrakt EII enthielt nur geringe Aktivität. Die Hälfte der Gesamtaktivität der eingesetzten Zellen bzw. 89% der in den Sphäroplasten enthaltenen Aktivität blieb mit den Partikeln (PII) verbunden.

Die Herstellung von Sphäroplasten führt bei verschiedenen gramnegativen Organismen, z.B. Escherichia coli, zur Freisetzung periplasmatischer Enzyme (NEU und HEPPEL, 1965; HEPPEL, 1971). Hierbei handelt es sich um Proteine, die im Bereich zwischen Cytoplasmamembran und äußeren Zellwandschichten lokalisiert sind. Sie werden jedoch nicht wie einige entsprechende Exoenzyme grampositiver Bakterien ins Medium ausgeschieden (HEPPEL, 1971). Allerdings werden auch bei der Herstellung von Sphäro- bzw. Protoplasten aus Bacillus subtilis (grampositiv) bestimmte Enzyme (Nukleasen) selektiv freigesetzt (BIRNBOIM, 1966; MOMOSE et al., 1964; MAUCK und GLASER, 1970).

Die vorliegenden Ergebnisse ließen eine Lokalisation der Fumarat-Reduktase von C. formicoaceticum nahe der Zelloberfläche möglich erscheinen. Eine spezifische Freisetzung bestimmter löslicher Enzyme bei der Einwirkung von Lysozym bzw. die sekundäre Anheftung ursprünglich löslicher Proteine an die Partikel ist jedoch nicht auszuschließen.

Um den Austritt von löslichen Enzymen bei der Sphäroplastenherstellung möglichst zu verhindern, wurde dabei HEPES als besonders membranschonender Puffer verwendet (GOOD et al., 1966).

Lysozymbehandlung von Zellen in 20 mM HEPES-KOH-Puffer pH 8 , 1 mM DTE erfolgte in Gegenwart von 0,6 M Saccharose bei 37 $^{o}$C. Nach 15 - 30 Minuten Inkubationsdauer hatten sich die Zellen zu Sphäroplasten abgerundet, deren Lyse durch die hohe Saccharosekonzentration verhindert wurde (MALAMY und HORECKER, 1961; HEPPEL, 1971). Durch Zentrifugation wurde der Sphäroplastenüberstand EI gewonnen, der blaßgelb gefärbt war. Die Sphäroplasten lysierten sehr schnell beim Resuspendieren in 20 mM HEPES-KOH pH 8 , 1 mM DTE ohne Saccharose. Nach Behandlung mit DNase wurde der Extrakt durch Zentrifugation (40 Minuten, 50 000 x g ) in einen klaren gelbbraunen Überstand (EII) und die Partikelfraktion (PII) aufgetrennt.

Die Verteilung der Fumarat-Reduktase-Aktivität mit FMN und MV in den Fraktionen zeigt Tab. 15.

Tab. 15 Aktivität der Fumarat-Reduktase in den Fraktionen nach Lysozymbehandlung von Zellen in HEPES-KOH-Puffer, 0,6 M Saccharose und osmotischer Lyse

| Fraktion | Gesamtaktivität (E) FMN | MV | Spezif. Aktivität (E/mg) FMN | MV |
|---|---|---|---|---|
| EI | 78 | 347 | 3,2 | 14 |
| EII | 7,2 | 32 | 0,07 | 0,27 |
| PII | 5,3 | 25 | 0,09 | 0,4 |

Extraktherstellung siehe Text und Methoden. Die manometrischen Messungen wurden durchgeführt, wie in der Legende zu Tab. 13 beschrieben. Zur Aktivitätsbestimmung wurden 0,1 - 0,2 ml (0,04 - 2,5 mg Protein) der verschiedenen Fraktionen nach Verdünnung eingesetzt.

EI = Sphäroplastenüberstand, EII = Extrakt, lösliche Fraktion, PII = Partikelfraktion.

Im Sphäroplastenüberstand befanden sich etwa 86% der Gesamtaktivität des Enzyms. Die hohe spezifische Aktivität in dieser Fraktion ist ein Hinweis darauf, daß die Fumarat-Reduktase selektiv freigesetzt wurde und die Aktivität im Puffer nicht auf Lyse von Zellen beruhte. Wie später gezeigt werden soll, wurden nur geringe Mengen löslicher Enzyme wie Acetat-Kinase und Malat-Enzym unter den genannten Bedingungen in den saccharosehaltigen Puffer abgegeben.

### 3.1.3. Stabilität der Fumarat-Reduktase-Aktivität mit reduziertem MV als Elektronendonator

Die Aktivität der Fumarat-Reduktase nahm während der Aufbewahrung bei -20 °C im Laufe eines Jahres nur um 38% ab (Tab. 16). Getestet wurde ein Sphäroplastenüberstand (EI) mit sehr hoher spezifischer Aktivität.

Tab. 16 Stabilität der Fumarat-Reduktase bei -20 °C

| Aufbewahrungsdauer (in Monaten) | Spezif. Aktivität (E/mg) | Aktivität (%) |
|---|---|---|
| 0 | 26 | 100 |
| 1 | 22 | 85 |
| 3 | 16 | 62 |
| 9 | 16 | 62 |
| 12 | 16 | 62 |

Zur Bestimmung wurde ein Sphäroplastenüberstand (EI; 20 mM HEPES-KOH pH 8 , 1 mM DTE, 0,6 M Saccharose) verwendet. Der Extrakt wurde bei -20 °C in einem anaerob verschlossenen Röhrchen aufbewahrt und nur zur Probenentnahme jeweils kurzzeitig aufgetaut. Die manometrischen Messungen erfolgten mit MV als Elektronenüberträger (siehe Legende zu Tab. 13). Es wurden jeweils 0,01 mg EI-Protein eingesetzt.

### 3.1.4. Aktivität der Fumarat-Reduktase in Zellen nach Anzucht auf verschiedenen Substraten

Ausgewachsene Zellen von C. formicoaceticum zeigten nach Anzucht auf L-Malat die gleiche Aktivität der Fumarat-Reduktase wie beim Wachstum auf Fumarat (Test mit MV). Extrakte von Zellen, die auf Fructose gewachsen waren, besaßen nur etwa ein Zehntel der Aktivität fumaratverwertender Zellen (Tab. 17). Nach Anzucht auf Glycerin, L-Glutamat und DL-Lactat betrug die spezifische Aktivität sogar nur 1 - 3% der beim Wachstum auf $C_4$-Dicarbonsäuren erhaltenen Werte.

Die Fumarat-Reduktase war demnach in C. formicoaceticum auch nach Anzucht auf den Substraten vorhanden, aus denen in vivo kein Succinat als Gärungsendprodukt gebildet wurde (vgl. Kap. 1.4.2.). Vorstellbar wäre eine anabolische Funktion des Enzyms unter diesen Wachstumsbedingungen (Porphyrinsynthese).

Tab. 17 Vergleich der Fumarat-Reduktase-Aktivität in Extrakten nach Anzucht auf Komplexmedium mit verschiedenen Substraten

| Substrat | Spezifische Aktivität (E/ mg) |
|---|---|
| Fumarat | 1,8 - 3,5 |
| L-Malat | 3,0 |
| Fructose | 0,16 - 0,48 |
| Glycerin | 0,05 |
| L-Glutamat | 0,06 |
| DL-Lactat | 0,1 |

Die Extrakte wurden durch Lysozymaufschluß in 20 mM HEPES-KOH-Puffer pH 8 , 1 mM DTE ohne Saccharose hergestellt. Die Aktivität in den nicht aufgetrennten Rohextrakten wurde nach entsprechender Verdünnung im manometrischen Test mit MV bestimmt (siehe Legende zu Tab. 13). Die jeweils eingesetzten 0,1 - 0,2 ml Extrakt enthielten 0,05 - 2 mg Protein.

Wurden die Zellen auf Fructose angezogen, abzentrifugiert und in fumarathaltiger Nährlösung resuspendiert, stieg die Aktivität der Fumarat-Reduktase im Verlauf des Wachstums nur auf das Doppelte des Ausgangswertes (Abb. 23). Die höchste spezifische Aktivität wurde erst beim Abknicken der Trübungskurve erreicht. Eine ausgeprägte Neusynthese des Enzyms fand offenbar nicht statt.

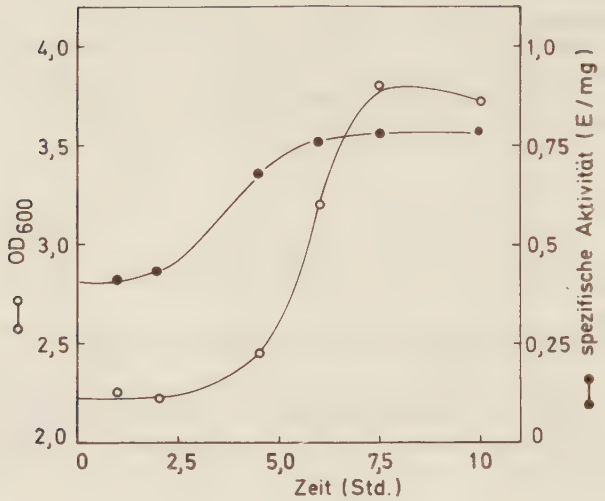



Abb. 23 Zunahme der Fumarat-Reduktase-Aktivität nach Übertragung wachsender Zellen von Fructose auf Fumarat

3 l Nährlösung mit 22 mM Fructose wurden mit C. formicoaceticum beimpft und 15 Stunden bei 37 °C bis zu einer OD (600 nm) von 3,0 inkubiert. Dann wurden 500 ml abzentrifugiert zur Bestimmung der Fumarat-Reduktase in den Zellen. Die Zellen aus 2,5 l wurden in 3 l Nährlösung mit 100 mM Fumarat ohne Bicarbonat oder Formiat aufgenommen. Inkubation erfolgte in einer 3 l-Glasflasche mit Auslauf und angeschlossenem Probennehmer bei 37 °C unter Stickstoff. In regelmäßigen Abständen wurden bei gleichzeitiger Begasung mit $O_2$-freiem Stickstoff Proben von 200 ml entnommen. Die Zellen wurden abzentrifugiert und eingefroren. Rohextrakte wurden durch Inkubation mit Lysozym in HEPES-KOH-Puffer ohne Saccharose hergestellt (siehe Methoden). Manometrische Bestimmung der Fumarat-Reduktase-Aktivität mit MV siehe Legende zu Tab. 13 und Methoden.

Zellen, die auf Minimalmedium (ANDREESEN, persönliche Mitteilung) mit verschiedenen Substraten gewachsen waren, enthielten teilweise eine sehr aktive Fumarat-Reduktase (Tab. 18).

Tab. 18 Aktivität der Fumarat-Reduktase in Rohextrakten von Zellen nach Anzucht auf Minimalmedium mit verschiedenen Substraten

| Substrat | Spezifische Aktivität (E/mg) |
|---|---|
| Pyruvat | < 0,01 |
| Ribose | 0,035 |
| Glutamat | 0,2 |
| Gluconat | 0,13 |
| Galakturonat | 0,35 |
| Glucuronat | 0,68 |

Die Aktivität der Fumarat-Reduktase wurde in nicht aufgetrennten Rohextrakten nach Lysozymaufschluß in 20 mM HEPES-KOH-Puffer pH 8, 1 mM DTE ohne Saccharose bestimmt. Die manometrischen Messungen wurden mit MV als Elektronencarrier durchgeführt (siehe Legende zu Tab. 13). Eingesetzt wurden je 0,1 ml Extrakt nach unterschiedlicher Verdünnung (0,2 - 1,5 mg Protein).

Lediglich nach Anzucht auf Pyruvat war keine Aktivität nachzuweisen. Unter den für Kohlenhydrate ermittelten Minimalbedingungen wurde Fumarat, Lactat und Glycerin von C. formicoaceticum nicht verwertet (ANDREESEN, persönliche Mitteilung).

### 3.1.5. Fumarat-Reduktase-Aktivität mit $NADH_2$, Formiat und Pyruvat als Elektronendonatoren

Bislang bekannte membrangebundene Fumarat-Reduktasen können im allgemeinen $NADH_2$ oder Formiat als direkten oder indirekten Elektronendonator verwenden, so z.B. die Enzyme von E. coli K 12 (SINGH und BRAGG, 1975), Streptococcus faecalis (FAUST und VANDEMARK, 1970), verschiedenen Propionibakterien (DE VRIES et al., 1973; SONE, 1974b; SCHWARTZ und SPORKENBACH, 1975),

Bacteroides spec. (WHITE et al., 1962; RIZZA et al., 1968; MACY et al., 1975) und Vibrio succinogenes (WOLIN et al., 1961; JACOBS und WOLIN, 1963a). Hinweise auf eine damit verbundene Energiegewinnung wurden durch direkte Messung der Phosphorylierung, Bestimmung von Wachstumserträgen bzw. durch Hemmstoffstudien gewonnen.

### 3.1.5.1. $NADH_2$ als Elektronendonator

Beim Wachstum auf Fumarat besaßen Zellen, die in der frühen lag-Phase (14 Stunden) geerntet wurden, eine niedrige Fumarat-Reduktase-Aktivität mit $NADH_2$. Dagegen war diese Fähigkeit in älteren Zellen nicht mehr nachweisbar. Die spezifische Aktivität in nicht aufgetrennten Rohextrakten betrug 0,02 - 0,03 E/mg Protein (Tab. 19); sie nahm jedoch bei Aufbewahrung im Kühlschrank innerhalb eines Tages um die Hälfte, bei -20 °C innerhalb von zwei Tagen um mehr als zwei Drittel ab.

Tab. 19 Vergleich der Fumarat-Reduktase-Aktivität mit $NADH_2$ und $MV_{red.}$ als Elektronendonatoren

| Fraktion | Spezifische Aktivität (E/mg Protein) | |
|---|---|---|
| | $NADH_2$ | $MV_{red.}$ |
| Gesamtextrakt (nicht aufgetrennt) | 0,023 | 3,5 |
| Extrakt (löslich) | 0 | 3,5 |
| Partikelfraktion | 0,029 | 2,5 |

Die verwendeten Zellen waren 14 Stunden auf Fumarat in Gegenwart von Formiat gewachsen. Die Extrakte wurden hergestellt durch Lysozymaufschluß in 20 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM $Mg^{2+}$, 1 mM DTE ohne Saccharose. Test mit $NADH_2$: Die Testansätze enthielten in 1 ml: 84 mM Tris-HCl pH 7,6 , 1 mM DTE, 0,56 mM $NADH_2$, 10 - 40 µl Extrakt (0,25 - 1,0 mg Protein). Die Ansätze wurden 20 Minuten mit $O_2$-freiem Stickstoff begast. Die $NADH_2$-Abnahme wurde bei 365 nm und 37 °C gemessen. Wenn die NADH-Oxidase-Aktivität auf eine Geschwindigkeit von $\Delta E/min = 0,01 - 0,02$ abgenommen hatte, wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 mM Fumarat gestartet. Test mit MV siehe Methoden und Legende zu Tab. 13.

Der Zusatz von 10 mM $Mg^{2+}$ bewirkte keine Beschleunigung der Reaktion.

Membranen von Escherichia coli K 12 und Streptococcus faecalis zeigten mit $NADH_2$ als Elektronendonator ähnlich geringe Fumarat-Reduktase-Aktivitäten (SINGH und BRAGG, 1975; FAUST und VANDEMARK, 1970).

Wie Tab. 19 zeigt, war die $NADH_2$-abhängige Reaktion fest mit den Partikeln verbunden. Dagegen konnte die mit reduziertem MV gemessene Aktivität auch in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden. Ein Lysozymaufschluß in Gegenwart von Saccharose bestätigte dieses Ergebnis: mit $NADH_2$ als Elektronendonator wurde Fumarat-Reduktase-Aktivität weder im Sphäroplastenüberstand noch in der löslichen Fraktion, sondern nur in den Partikeln gemessen. Mit reduziertem MV wurde dagegen die in Kap. 3.1.2. beschriebene Verteilung des Enzyms gefunden: die Aktivität befand sich überwiegend im Sphäroplastenüberstand und nur zu einem kleinen Teil in der Partikelfraktion.

Für die Fumaratreduktion durch $NADH_2$ wurden demnach zusätzliche Komponenten der Membranen benötigt, während der unphysiologische Elektronendonator MV direkt auch mit dem solubilisierten Enzym reagierte. An den meisten bisher beschriebenen $NADH_2$-Fumarat-Reduktasen ist entweder ein Menachinon allein oder in Verbindung mit einem Cytochrom b beteiligt, z.B. bei Escherichia coli (SINGH und BRAGG, 1975) und Propionibakterien (DE VRIES et al., 1973; SONE, 1974b; SCHWARTZ und SPORKENBACH, 1975).

Die nach Lysozymaufschluß im Sphäroplastenüberstand und im Extrakt enthaltene Fumarat-Reduktase-Aktivität ließ sich durch zweistündige Zentrifugation bei 100 000 x g nicht sedimentieren. Das weist darauf hin, daß das Enzym nicht an Membranfragmente gebunden war, sondern vollständig gelöst vorlag.

### 3.1.5.2. Formiat als Elektronendonator

Die Gärbilanzen der Wachstums- und Gärversuche mit Fumarat und Formiat ließen den Schluß zu, daß Formiat zur Fumaratreduktion verwendet wurde. Diese Reaktion wurde bei Vibrio succinogenes von JACOBS und WOLIN (1963a,b) näher untersucht.

Mit Hilfe von Endpunktsbestimmungen sollte Fumaratreduktion durch Formiat in Extrakten von C. formicoaceticum nachgewiesen werden.

Ein Ansatz, der Phosphatpuffer pH 7,7 , 10 mM DTE, 10 mM Fumarat, 20 mM Formiat und 20 µl eines nicht aufgetrennten Rohextraktes (0,2 mg Protein) enthielt, zeigte deutliche Succinatbildung, während in Abwesenheit von Formiat Fumarat vollständig zu Malat umgesetzt wurde. Die Aktivität der formiatabhängigen Reaktion betrug etwa 0,9 E/mg Protein.

Wurden dem Testansatz außer Fumarat und Formiat 10 mM MV zugesetzt, war eine wesentlich höhere Succinatbildung in Abhängigkeit von Formiat zu verzeichnen als ohne den Elektronencarrier. Dies ist leicht verständlich, da C. formicoaceticum eine aktive Formiat-Dehydrogenase besitzt, die MV sehr schnell reduziert (ANDREESEN et al., 1974). Reduziertes MV wiederum ist ein günstiger Elektronendonator für die Fumarat-Reduktase. Mit 10 µl eines nicht aufgetrennten Extrakts (0,14 mg Protein) verlief die Reaktion mindestens 6 Minuten lang linear. Die spezifische Aktivität betrug etwa 2,5 E/mg Protein. Allerdings waren die Bestimmungen mit und ohne MV sehr schlecht extraktproportional; durch Verdopplung der Extraktmenge wurde eine mehr als zweifache Steigerung der Aktivität erzielt. Die gefundene MV-abhängige Aktivität stimmte etwa mit den in Warburg-Experimenten ermittelten Raten überein.

### 3.1.5.3. Pyruvat als Elektronendonator

Da Pyruvat bei der Oxidation von Fumarat zu Acetat als Zwischenprodukt auftritt, lag die Vermutung nahe, daß Elektronen von dieser Verbindung direkt auf Fumarat übertragen werden konnten,

etwa durch Kopplung der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase mit der Fumarat-Reduktase. Ebenso könnte im Verlauf einer möglichen Pyruvat-Formiat-Lyase-Reaktion gebildetes Formiat sofort durch die Fumarat-Reduktase umgesetzt werden. Eine Pyruvat-Formiat-Lyase konnte bei C. formicoaceticum jedoch bislang nicht gefunden werden (ANDREESEN et al., 1974). Der Besitz einer $CO_2$-Reduktase (Formiat-Dehydrogenase) scheint z.B. bei C. pasteurianum das gleichzeitige Vorkommen einer Pyruvat-Formiat-Lyase auszuschließen (THAUER et al., 1972). Rohextrakte von Desulfovibrio gigas besitzen die Fähigkeit, Elektronen von Pyruvat auf Fumarat zu übertragen (HATCHIKIAN und LE GALL, 1970b).

Der Nachweis einer Fumaratreduktion durch Pyruvat in Extrakten von C. formicoaceticum bereitete jedoch Schwierigkeiten. Enthielten die Ansätze TEA-HCl- oder Phosphatpuffer pH 7,6 , 10 mM DTE, 10 mM Pyruvat, 10 mM Fumarat, 0,02 mM Coenzym A und 0,05 ml nicht aufgetrennten Extrakt (1 mg Protein), war nur bei Zusatz von MV eine meßbare Pyruvatabnahme zu verzeichnen. Die Reaktion verlief jedoch nicht linear und nicht extraktproportional. Alle Ansätze, die Fumarat und MV enthielten, waren im Gegensatz zu denen ohne Fumarat blaßblau gefärbt; reduziertes MV besitzt eine kräftig blauviolette Färbung. Die Farbunterschiede der Testansätze deuten darauf hin, daß die Reduktion des Methylviologens die Geschwindigkeit der Fumarat-Reduktase-Reaktion begrenzte. Der Zusatz von 0,5 mM Thiaminpyrophosphat beschleunigte die Succinatbildung, aber Extraktproportionalität war auch dadurch nicht zu erreichen.

Fest gebundenes Thiaminpyrophosphat ist Cofaktor der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase von C. acidi-urici (UYEDA und RABINOWITZ, 1971). Das pyruvatspaltende Enzym aus C. formicoaceticum verwendet wie jenes aus C. acidi-urici auch MV als Elektronenakzeptor (ANDREESEN et al., 1974). Grundsätzlich müßte also eine Kopplung der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase mit der Fumarat-Reduktase durch den Redoxfarbstoff möglich sein. Allerdings weichen die pH-Optima der beiden Enzyme um mehr als eine pH-Einheit voneinander ab (Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase pH 6,7;

ANDREESEN et al., 1974). Außerdem ist das komplexe pyruvatspaltende Enzymsystem relativ instabil (ANDREESEN et al., 1974). Diese Faktoren könnten für die geringe Aktivität der pyruvatabhängigen Fumaratreduktion zumindest in vitro verantwortlich sein.

### 3.1.6. Versuche zum Nachweis einer Succinat-Dehydrogenase-Aktivität

In Rohextrakten von Zellen nach Anzucht auf Fumarat war zu keiner Zeit des Wachstums eine Rückreaktion der Fumarat-Reduktase nachweisbar. 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCPIP) und $K_3Fe(CN)_6$ wurden zwar durch Extrakte reduziert, aber die Reaktionen waren nicht succinatabhängig. Die Zugabe von Phenazinmethosulfat (PMS) hatte keinen Einfluß. Ebenso war weder mit noch ohne PMS eine NAD-Reduktion durch Succinat zu beobachten. Auch 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) wurde nicht zum Formazan reduziert.

Extrakte aus Vibrio succinogenes katalysieren eine Succinat-Dehydrogenierung nur in Gegenwart von Tetrazolium-Salzen (JACOBS und WOLIN, 1963a).

Auch Variationen der Testbedingungen (Puffer, pH) und der Substratkonzentrationen führten nicht zu einem positiven Ergebnis. Da C. formicoaceticum Succinat nicht verwerten kann, scheint eine Succinat-Dehydrogenase auch nicht notwendig und nicht sinnvoll zu sein.

## 3.2. Fumarase

Wachsende und ruhende Zellen von C. formicoaceticum setzen Fumarat sehr schnell zu Malat um. Diese Reaktion wird durch die Fumarase (EC 4.2.1.2.) katalysiert:

$$\text{L-Malat} \underset{+\ H_2O}{\overset{-\ H_2O}{\rightleftharpoons}} \text{Fumarat}$$

Fumarat absorbiert auf Grund seiner Doppelbindung im kurzwelligen UV-Bereich. Diese Eigenschaft ist die Grundlage des Enzym-

tests (RACKER, 1950). Wegen der hohen spezifischen Absorption des Fumarats war allerdings der Substratumsatz bei 250 nm in Gegenwart von mehr als 1 mM Fumarat mit den verfügbaren Spektralphotometern nicht meßbar. Der Nachweis der Reaktion Malat ⟶ Fumarat bei 250 nm (BERGMEYER, 1974) wurde durch eine hohe Blindreaktion ohne Substrat beeinträchtigt. Der Umsatz des Malats verlief nur kurze Zeit linear. Zudem konnten wegen der hohen Grundabsorption des Reaktionsansatzes in Gegenwart von Extrakt maximal 15 mM L-Malat eingesetzt werden. Diese Menge entsprach möglicherweise noch nicht der Sättigungskonzentration; BERGMEYER (1974) gibt 50 mM an. Daher liegen die gemessenen Aktivitäten möglicherweise unter den maximal erreichbaren Werten. Das pH-Optimum der Reaktion mit Malat lag etwa bei pH 9,0. Ein linearer Verlauf wurde mit 5 - 20 µl Extrakt (entsprechend 0,1 - 0,4 mg Protein) beobachtet. Für die Berechnungen (Tab. 20) wurde der Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{250\,nm}$ (Fumarat) = 1,45 $mM^{-1} \cdot cm^{-1}$ verwendet (BERGMEYER, 1974). In Extrakten eingefrorener Zellen war Fumarase-Aktivität nicht nachweisbar.

Tab. 20 Aktivität der Fumarase bei verschiedenen pH-Werten

| Testbedingungen | Spezifische Aktivität (E/mg) |
|---|---|
| 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 | 0,115 |
| 0,1 M HEPES-KOH, pH 8,5 | 0,153 |
| 0,1 M Tris-HCl, pH 8,8 | 0,206 |

Der Testansatz enthielt in 1 ml neben dem jeweiligen Puffer 15 mM L-Malat sowie 5 - 20 µl Extrakt (EII nach Lysozymaufschluß mit 0,6 M Saccharose, siehe Kap. 3.1.2. und Methoden), entsprechend 0,1 - 0,4 mg Protein. Die Bestimmung erfolgte bei einer Wellenlänge von 250 nm und einer Temperatur von 37 °C in anaerob verschlossenen Küvetten.

### 3.3. Malat-Enzym

Die Aktivität einer Malat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.37), die die Reaktion L-Malat + NAD ⟷ Oxalacetat + $NADH_2$ durchführt (YOSHIDA, 1969), wurde in Zellen von C. formicoaceticum nach

Anzucht auf Fumarat oder L-Malat weder mit L-Malat noch mit Oxalacetat als Substrat gefunden. Dagegen wurden NAD und NADP reduziert, wenn der Testansatz L-Malat und $Mn^{2+}$- oder $Mg^{2+}$-Ionen enthielt. Das deutete auf das Vorhandensein eines Malat-Enzyms (L-Malat : NAD(P)-Oxidoreduktase, decarboxylierend) hin. Enzyme mit der gleichen Funktion wurden in zahlreichen Tieren, Pflanzen und Bakterien gefunden. Die Malat-Enzyme aus höheren Organismen sind meistens NADP-spezifisch (EC 1.1.1.39; SAZ und HUBBARD, 1957; EC 1.1.1.40; OCHOA, 1955), die der Bakterien verwenden NAD (EC 1.1.1.38) oder NADP als Elektronenakzeptor (MURAI et al., 1972).

Tab. 21 zeigt die Aktivitäten des Malat-Enzyms in Extrakten von C. formicoaceticum nach Anzucht auf Fumarat und L-Malat.

Tab. 21 Spezifische Aktivität des Malat-Enzyms in Rohextrakten frischer Zellen nach French-Press- und Lysozymaufschluß

| Anzucht | Aufschluß | Spezifische Aktivität (E/mg) NAD | NADP |
|---|---|---|---|
| Fumarat | French-Presse | 0,051 | 0,048 |
| L-Malat | French-Presse | 0,01 | 0,012 |
| Fumarat | Lysozym | 0,3 - 0,5 | 0,33 |
| L-Malat | Lysozym | 0,95 - 1,0 | 0,35 - 0,75 |

Der Lysozymaufschluß erfolgte durch Inkubation in Gegenwart von 0,6 M Saccharose und nachfolgender Lyse der Sphäroplasten. Weitere Angaben zur Extraktherstellung siehe Methoden. Die Testansätze enthielten in 1 ml: 20 mM HEPES-KOH-Puffer pH 8, 1 mM DTE, 1 mM $MnCl_2$, 15 mM L-Malat, 5 - 20 µl Extrakt (lösliche Fraktion) entsprechend 0,1 - 0,8 mg Protein und 0,6 mM NAD bzw. NADP (= Start). Die Zunahme der Extinktion bei 365 nm wurde in anaeroben Küvetten bei 37 °C gemessen.

Die höchste Aktivität wurde in 20 mM HEPES-KOH-Puffer pH 8,0 gemessen; in Tris-HCl-Puffer pH 8,0 betrug sie nur $\frac{1}{3}$, in HEPES-KOH-Puffer pH 8,5 nur $\frac{2}{3}$ des Höchstwertes.

Das Enzym erwies sich sowohl beim Aufschluß als auch bei Lagerung als sehr labil. Bei French-Press-Aufschluß war eine wesentlich geringere Aktivität vorhanden als nach Extraktherstellung mit Lysozym. In Extrakten eingefrorener Zellen wurden höchstens 0,05 - 0,07 E/mg Protein nachgewiesen. Aufbewahrung bei 4 $^{o}$C führte innerhalb von 24 Stunden zu einer Abnahme der Aktivität mit NADP um 40 bis maximal 90%; eine NAD-Reduktion wurde danach nicht mehr beobachtet. Dieser Befund könnte damit erklärt werden, daß wie z.B. bei Escherichia coli (KATSUKI et al., 1967) anstelle eines unspezifischen Enzyms zwei spezifische Proteine an der Reaktion beteiligt sind. Eine Entscheidung zwischen den beiden Möglichkeiten kann auf Grund der vorliegenden, mit Rohextrakten gewonnenen Ergebnisse jedoch nicht getroffen werden.

Die reduktive Carboxylierung von Pyruvat verlief nur mit sehr geringer Rate (spezifische Aktivität 0,01 E/mg). Nach Anzucht auf Fructose betrug die Aktivität des Enzyms im Test mit L-Malat nur 0,023 E/mg. Demnach besteht die physiologische Funktion des Malat-Enzyms bei C. formicoaceticum im Abbau von $C_4$-Dicarbonsäuren. Die meisten bisher beschriebenen bakteriellen Enzyme katalysieren in vivo die oxidative Decarboxylierung von L-Malat.

Der Einsatz von 30 mM Fumarat anstelle von 15 mM L-Malat im Test ermöglichte einen indirekten Nachweis der Fumarase (RAUEN, 1964). Nach einer lag-Phase von 1 - 2 Minuten verliefen die Reaktionen linear und extraktproportional. Da die Bestimmung bei pH 8, dem pH-Optimum des Malat-Enzyms, durchgeführt wurde, das pH-Optimum der Fumarase jedoch etwa bei pH 9 lag, waren nur niedrige Aktivitäten zu erwarten. Die Messungen ergaben 0,077 E/mg Protein. Das entspricht etwa den im direkten Test der Fumarase bei pH 8 mit L-Malat bestimmten Werten (Tab. 21).

### 3.4. Acetat-Kinase

Beim Wachstum auf Fumarat und L-Malat enthielt C. formicoaceticum eine aktive Acetat-Kinase (EC 2.7.2.1.; Tab. 22). LINKE (1967) hatte das Enzym in Zellen des Stammes El Ghazzawi nach Anzucht

auf Fructose nachgewiesen.

Tab. 22 Aktivität der Acetat-Kinase in Rohextrakten von Zellen nach Anzucht auf Fumarat, L-Malat und Fructose

| Substrat | Spezifische Aktivität (E/mg) |
|---|---|
| Fumarat | 10,5 |
| L-Malat | 2,7 |
| Fructose | 2,1 |

Die Anzucht auf Fumarat und L-Malat erfolgte in Gegenwart von Formiat, auf Fructose in Anwesenheit von Bicarbonat. Die Extrakte wurden durch Lysozymbehandlung in 20 mM HEPES-KOH-Puffer pH 8, 1 mM DTE, 0,6 M Saccharose und anschließende Lyse der Sphäroplasten hergestellt (siehe Methoden). Die Testansätze enthielten in 1 ml: 0,1 M Tris-HCl pH 7,4 , 0,8 M Acetat, 0,2 M KCl, 4 mM ATP, 4 mM $MgCl_2$, 1,6 mM PEP, 0,4 mM $NADH_2$, 2 µl Pyruvat-Kinase (10 mg/ml), 10 µl LDH (10 mg/ml), 1 - 5 µl Rohextrakt entsprechend 0,015 - 0,1 mg Protein (lösliche Fraktion EII nach Lysozymaufschluß). Der $NADH_2$-Verbrauch wurde bei 365 nm und 37 °C in anaeroben Küvetten gemessen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Extrakt gestartet. Die $NADH_2$-Oxidase-Aktivität wurde in einem Kontrollansatz ohne Acetat bestimmt.

Die Acetat-Kinase ist unter den genannten Wachstumsbedingungen an der Acetatbildung beteiligt (Pyruvatspaltung) und dient der Energiegewinnung. Es ist bemerkenswert, daß in Zellen nach Anzucht auf Fumarat höhere Aktivitäten des Enzyms als nach Anzucht auf Malat nachzuweisen waren, obwohl bei Fumaratvergärung weniger Acetat gebildet wurde. Dieser Befund ist vorläufig nicht zu erklären.

Rohextrakte von C. thermoaceticum enthielten eine ähnlich hohe Acetat-Kinase-Aktivität (SCHAUPP und LJUNGDAHL, 1974).

Die genannten, an der Fumarat- und Malatvergärung durch C. formicoaceticum beteiligten Reaktionen sind in Abb. 6 (Kap. 1.1.2.1.) dargestellt.

### 3.5. Formiat-Dehydrogenase

Formiat wurde durch wachsende und ruhende Zellen in Gegenwart von Fumarat oder L-Malat schnell umgesetzt. Es war anzunehmen, daß am Formiatabbau bzw. an der Übertragung der Reduktionsäquivalente auf Fumarat eine Formiat-Dehydrogenase beteiligt war. Die Aktivität dieses Enzyms wurde bereits nach Anzucht auf Fructose nachgewiesen (ANDREESEN et al., 1974). In Rohextrakten von Zellen, die auf Fumarat oder L-Malat in Gegenwart von $Fe^{3+}$, $Mo^{6+}$ und $Se^{4+}$ gewachsen waren, betrug die spezifische Aktivität bei Messung mit MV als Elektronenakzeptor einheitlich 0,6 - 1,2 E/mg Protein. Beim Wachstum auf Fructose wurden 3,4 E/mg bestimmt, wenn die Nährlösung die genannten Metalle enthielt, jedoch 8,5 E/mg in Gegenwart von $W^{6+}$ anstelle von $Mo^{6+}$ (ANDREESEN et al., 1974). C. formicoaceticum und C. thermoaceticum bilden auch in Gegenwart von Wolfram eine aktive Formiat-Dehydrogenase (ANDREESEN und LJUNGDAHL, 1973; ANDREESEN et al., 1974; LJUNGDAHL und ANDREESEN, 1975), während z.B. das Mo- und Se-haltige Enzym aus Escherichia coli bei Austausch des $Mo^{6+}$ gegen $W^{6+}$ inaktiv ist (PINSENT, 1954).

### 3.6. Verteilung von Fumarat-Reduktase, Malat-Enzym und Acetat-Kinase in den Extraktfraktionen nach Lysozymaufschluß bzw. osmotischem Schock ganzer Zellen

Die bei Lysozymbehandlung und anschließender osmotischer Lyse (Kap. 3.1.2. und Tab. 15) beobachtete Verteilung der Fumarat-Reduktase zwischen Sphäroplastenüberstand (EI), löslicher Fraktion (EII) und Partikeln (PII) wies darauf hin, daß das Enzym membrangebunden sein könnte. Zum Vergleich wurde die Verteilung zweier normalerweise löslicher Enzyme, Malat-Enzym und Acetat-Kinase, in den genannten Fraktionen bestimmt (Tab. 23).

Wie die Tabelle zeigt, wurde nur ein kleiner Teil des Malat-Enzyms und der Acetat-Kinase unter diesen Versuchsbedingungen in den Sphäroplastenüberstand abgegeben, während 86% der Fumarat-Reduktase-Aktivität in dieser Fraktion nachgewiesen wurden.

Tab. 23 Verteilung der Aktivität von Fumarat-Reduktase, Malat-Enzym und Acetat-Kinase in den Fraktionen nach Lysozym-behandlung in 20 mM HEPES-KOH mit 0,6 M Saccharose und anschließender Lyse

| | | Fumarat-Reduktase (MV)[1] | Malat-Enzym (NAD)[1] | Acetat-Kinase |
|---|---|---|---|---|
| EI | Spezif. Aktivität (E/mg) | 14,2 | 0,19 | 2,3 |
| | Gesamt-aktivität (E) | 346 (86%)[2] | 4,6 (7%) | 57 (5%) |
| EII | Spezif. Aktivität (E/mg) | 0,3 | 0,5 | 10,5 |
| | Gesamt-aktivität (E) | 32 (8%) | 53 (83%) | 1108 (89%) |
| PII | Spezif. Aktivität (E/mg) | 0,4 | 0,1 | 1,1 |
| | Gesamt-aktivität (E) | 25 (6%) | 6,7 (10%) | 69 (6%) |

Zur Extraktherstellung wurden 1,6 g frische Zellen (Anzucht auf 100 mM Fumarat mit 120 mM Formiat) in 7 ml 20 mM HEPES-KOH-Puffer pH 8,0 , 1 mM DTE, 0,6 M Saccharose suspendiert. Einzelheiten zum Aufschluß und zu den Bestimmungen siehe Methoden bzw. Legende zu Tab. 13, Tab. 21 und Tab. 22.
EI = Sphäroplastenüberstand (24,5 mg Gesamtprotein), EII = lösliche Fraktion (105 mg Protein) und PII = Partikelfraktion (61 mg Protein).

[1] Im Test verwendeter Elektronendonator bzw. -akzeptor

[2] Die Werte in Klammern geben an: Gesamtaktivität der betreffenden Fraktion/ Summe der Gesamtaktivitäten (EI + EII + PII) in %.

Bei gleichem Aufschlußverfahren waren auch in Extrakten von Zellen, die unter anderen Bedingungen angezogen worden waren (Fumarat ohne Bicarbonat, Fumarat / 120 mM Bicarbonat sowie Malat mit

oder ohne die genannten Zusätze), die Enzyme nach dem gleichen Muster verteilt. Dieses Ergebnis stützt die Annahme, daß die Fumarat-Reduktase außen in oder auf der Membran bzw. im periplasmatischen Raum lokalisiert sein könnte. Allerdings ist selektiver Austritt des Enzyms aus dem Cytoplasma nach wie vor nicht völlig auszuschließen. Die in konzentrierter Saccharoselösung eintretende Plasmolyse könnte die Permeabilität der Membran für kleinere Proteine erhöhen.

Eine beträchtliche Freisetzung auch der löslichen Enzyme während der Einwirkung von Lysozym wurde erreicht, wenn Zellen in einem größeren Volumen (3 g Naßgewicht/120 ml) 20 mM Tris-HCl-Puffer pH 8 mit 1 mM EDTA und 0,6 M Saccharose mit Lysozym inkubiert wurden. Tab. 24 zeigt, daß außer der Fumarat-Reduktase auch die Acetat-Kinase unter diesen Bedingungen fast vollständig in den Sphäroplastenüberstand gelangte, obwohl bei mikroskopischer Kontrolle nur wenige lysierte Zellen zu erkennen waren. Die Einwirkung von EDTA verbunden mit Plasmolyse und hoher Verdünnung der Zellen erhöhte offenbar deren Permeabilität beträchtlich. Die nahezu quantitative Freisetzung der Acetat-Kinase im Gegensatz zum Malat-Enzym könnte auf unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Enzyme (Molekulargewicht, Ladung, Molekülgestalt usw.) beruhen. Diese Faktoren könnten allerdings auch für eine spezifische Abgabe der Fumarat-Reduktase verantwortlich sein und eine Beziehung zur Membran vortäuschen.

EDTA macht Protoplasten von Escherichia coli durchlässig für Substanzen, die normalerweise die Membran nicht passieren können (HEPPEL, 1967).

Typische periplasmatische Proteine gramnegativer und grampositiver Bakterien werden leicht durch osmotischen Schock der Zellen solubilisiert (ANRAKU und HEPPEL, 1967; HEPPEL, 1971). Dazu werden ganze Zellen in einem Puffer hoher Osmolarität suspendiert, nach kurzer Inkubation zentrifugiert und in Wasser oder 1 mM $MgCl_2$-Lösung aufgenommen. Die dabei erfolgende schnelle Volumenvergrößerung der vorher plasmolysierten Zellen bewirkt die spezifische Abgabe periplasmatischer Proteine ins Medium ("shock fluid").

Tab. 24 Verteilung von Fumarat-Reduktase, Malat-Enzym und Acetat-Kinase in den Fraktionen nach Lysozymbehandlung in 20 mM Tris-HCl-Puffer mit 1 mM EDTA und 0,6 M Saccharose und osmotischer Lyse der Sphäroplasten

| | | Fumarat-Reduktase (MV)[1] | Malat-Enzym (NAD)[1] | Acetat-Kinase |
|---|---|---|---|---|
| EI | Spezif. Aktivität (E/mg) | 2,45 | 0,07 | 6,0 |
| | Gesamtaktivität (E) | 548 (97,7%)[2] | 15 (47%) | 1340 (96,7%) |
| EII | Spezif. Aktivität (E/mg) | 0,06 | 0,1 | 0,27 |
| | Gesamtaktivität (E) | 11 (1,9%) | 16,7 (52,5%) | 45 (3%) |
| PII | Spezif. Aktivität (E/mg) | 0,06 | 0,004 | 0,1 |
| | Gesamtaktivität (E) | 2,3 (0,4%) | 0,15 (0,5%) | 3,9 (0,3%) |

Zur Extraktherstellung wurden 3 g frische Zellen nach Anzucht auf Fumarat in Gegenwart von Formiat einmal mit 10 ml 20 mM Tris-HCl-Puffer pH 8, 1 mM DTE gewaschen und in 120 ml des gleichen Puffers mit 0,6 M Saccharose und 1 mM EDTA resuspendiert. Sie wurden mit 0,1 mg Lysozym/ml 60 Minuten bei 37 °C unter Stickstoff inkubiert. Die Sphäroplasten wurden durch Zentrifugation (20 Minuten, 10 000 x g) abgetrennt und in 100 ml Tris-HCl-Puffer pH 8, 1 mM DTE, 1 mM $MgCl_2$ mit 1 mg DNase aufgenommen. Nach vollständiger Lyse wurde der Extrakt 30 Minuten bei 27 000 x g zentrifugiert.
EI = Sphäroplastenüberstand (224 mg Gesamtprotein), EII = Extrakt (165 mg Gesamtprotein) und PII = Partikel (36 mg Protein).
Weitere Erläuterungen siehe Legende zu Tab. 23 und Methoden.

[1] Elektronendonator bzw. -akzeptor im Test

[2] Die Werte geben den Anteil der Gesamtaktivität in den betreffenden Fraktionen an, bezogen auf EI + EII + PII = 100%.

Tab. 25 Verteilung von Fumarat-Reduktase, Malat-Enzym und Acetat-Kinase in den Fraktionen nach osmotischem Schock der Zellen in Tris-Puffer mit EDTA

| | | Fumarat-Reduktase (MV)[1] | Malat-Enzym (NAD)[1] | Acetat-Kinase |
|---|---|---|---|---|
| EI o.S. | Spezif. Aktivität (E/mg) | 1,8 | 0,22 | 1,65 |
| | Gesamtaktivität (E) | 195 (79,3%)[2] | 24 (28%) | 181 (47%) |
| EII o.S. | Spezif. Aktivität (E/mg) | 0,37 | 0,25 | 1,33 |
| | Gesamtaktivität (E) | 41 (16,7%) | 27,3 (32%) | 147 (38%) |
| Gesamtextrakt | Spezif. Aktivität (E/mg) | 0,04 | 0,12 | 0,21 |
| | Gesamtaktivität (E) | 10 (4%) | 35 (40%) | 59 (15%) |

2,8 g frisch geerntete Zellen (Wachstum auf 100 mM Fumarat/120 mM Formiat) wurden anaerob in 200 ml 20 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,7, 1 mM DTE, 0,1 mM EDTA, 0,6 M Saccharose suspendiert, bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert, zentrifugiert und in 200 ml kalter 1 mM $MgCl_2$-Lösung aufgenommen. Nach Zentrifugation wurden die ganzen Zellen in 10 ml 20 mM HEPES-KOH-Puffer pH 8 plus 1 mM DTE resuspendiert und mit 1 mg Lysozym/ml bis zur vollständigen Lyse inkubiert (genaue Durchführung siehe Methoden).
EI o.S.: Überstand nach der 1. Zentrifugation (Tris/EDTA/Saccharose) mit 110 mg Gesamtprotein; EII o.S.: Überstand nach der 2. Zentrifugation, "shock fluid" ($MgCl_2$) mit 111 mg Protein; Gesamtextrakt: Extrakt der Zellen nach Inkubation mit Lysozym, nicht aufgetrennt (285 mg Protein).

[1] Elektronendonator bzw. -akzeptor im Test

[2] Die Werte in Klammern geben den Anteil der Gesamtaktivität in den betreffenden Fraktionen an, bezogen auf EI + EII + Gesamtextrakt = 100%.

Wurden Zellen von C. formicoaceticum einer Schockbehandlung in Tris-HCl-Puffer mit EDTA und Saccharose unterworfen, wurden schon während der kurzzeitigen Einwirkung des hypertonischen Mediums außer der Fumarat-Reduktase auch lösliche Enzyme freigesetzt (Tab. 25). Der Anteil der Fumarat-Reduktase in diesem Puffer war allerdings wesentlich höher als der des Malat-Enzyms und der Acetat-Kinase. Bei der eigentlichen Schockbehandlung, dem Resuspendieren der Zellen in 1 mM $MgCl_2$-Lösung, gelangte die restliche, in den Zellen verbliebene Aktivität der Fumarat-Reduktase ins Medium; aber gleichzeitig waren 30 - 40% der Gesamtaktivität des Malat-Enzyms und der Acetat-Kinase in dieser Fraktion zu finden. Demnach bewirkte schon die Einwirkung von Tris und EDTA in Gegenwart von Saccharose eine Veränderung der Zellgrenzschichten, die den Austritt zellinterner Proteine erlaubte oder zur Lyse einiger Zellen führte. Bei mikroskopischer Kontrolle waren jedoch überwiegend morphologisch intakte Zellen zu erkennen.

Die Komplexierung von Metallionen wie $Ca^{2+}$ durch EDTA bewirkt bei Escherichia coli die Ablösung von etwa 50% der äußeren Lipopolysaccharidschichten (HEPPEL, 1967). Tris und EDTA verändern durch Entfernung von Ionen die Oberflächenladung oder -konfiguration von Escherichia coli (GOLDSCHMIDT et al., 1967). Die Bindung von Metallionen, die die Funktionsfähigkeit der Zellgrenzschichten erhalten, könnte auch der Grund für die bei C. formicoaceticum beobachtete Labilisierung von Zellen und Sphäroplasten durch EDTA sein.

Wurden Zellen in konzentrierter Suspension (1 g Naßgewicht/5 ml HEPES-KOH-Puffer pH 8) in Gegenwart von Saccharose, aber ohne EDTA inkubiert und nach Zentrifugation im gleichen Puffer ohne Saccharose resuspendiert, ergab sich eine andere Verteilung der Enzyme (Tab. 26). Der HEPES-Puffer mit Saccharose enthielt nur geringe Aktivitäten der Enzyme. Malat-Enzym und Acetat-Kinase befanden sich überwiegend im Gesamtextrakt. 22% der Fumarat-Reduktase wurden durch die Schockbehandlung freigesetzt, über 70% blieben jedoch mit den Zellen verbunden. Entfernte man dagegen die Mureinschicht durch Behandlung mit Lysozym, wurde das Enzym weitgehend solubilisiert.

Tab. 26 Verteilung von Fumarat-Reduktase, Malat-Enzym und Acetat-Kinase in den Fraktionen nach osmotischem Schock ganzer Zellen in HEPES-Puffer

| | | Fumarat-Reduktase (MV) [1] | Malat-Enzym (NAD) [1] | Acetat-Kinase |
|---|---|---|---|---|
| EI o.S. | Spezif. Aktivität (E/mg) | 1,4 | 0,1 | 0,8 |
| | Gesamtaktivität (E) | 9,4 (6,5%) [2] | 0,74 (8,5%) | 5,5 (6,6%) |
| EII o.S. | Spezif. Aktivität (E/mg) | 4,9 | 0,14 | 1,1 |
| | Gesamtaktivität (E) | 32 (22%) | 0,9 (10,5%) | 7,2 (8,7%) |
| Gesamtextrakt | Spezif. Aktivität (E/mg) | 0,9 | 0,06 | 0,56 |
| | Gesamtaktivität (E) | 104 (71,5%) | 6,9 (81%) | 67 (84,7%) |

1,25 g frische, auf Fumarat mit Formiat angezogene Zellen wurden anaerob in 5 ml 20 mM HEPES-KOH-Puffer pH 8, 1 mM DTE, 1 mM $MgCl_2$, 0,6 M Saccharose suspendiert, 20 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen, abzentrifugiert (Überstand = EI o.S. mit 6,8 mg Gesamtprotein), in 10 ml des gleichen Puffers ohne Saccharose aufgenommen und nach kurzer Inkubation (10 Minuten) wiederum zentrifugiert (Überstand = EII o.S. mit 6,5 mg Protein). Die ganzen Zellen wurden anschließend in 10 ml des genannten Puffers resuspendiert und mit Lysozym bis zur vollständigen Lyse inkubiert (Gesamtextrakt, 120 mg Protein).

[1] Elektronendonator bzw. -akzeptor im Test

[2] Anteil der Gesamtaktivität in den entsprechenden Fraktionen, bezogen auf EI + EII + Gesamtextrakt = 100%.

Die aufgeführten Daten lassen erkennen, daß in einem membranschonenden Puffer ohne EDTA die Permeabilität der äußeren Zellgrenzschichten durch osmotischen Schock nicht wesentlich erhöht

wurde. Wenn es sich bei der Fumarat-Reduktase um ein außerhalb der Cytoplasmamembran lokalisiertes Protein handelte, wäre analog den Beobachtungen bei anderen Organismen ein vollständiger Übergang in den Schockpuffer zu erwarten gewesen (HEPPEL, 1971). Eine dicke, stark vernetzte Mureinschicht, wie sie bei grampositiven Organismen vorkommt, könnte allerdings unter bestimmten Bedingungen den Austritt von Proteinen verhindern. Im allgemeinen stellt das Mureingerüst jedoch keine Permeabilitätsschranke dar (WEIBULL, 1956; SALTON, 1960).

EL GHAZZAWI (1967) und ANDREESEN et al. (1970) beschrieben C. formicoaceticum als gramnegativ, was ungewöhnlich für die Gattung Clostridium ist (SMITH und HOBBS, 1974). Da gramnegative Organismen einen einschichtigen Mureinsacculus und darauf eine unterschiedlich dicke Lipopolysaccharidschicht besitzen, könnte der Austritt z.B. außen auf der Cytoplasmamembran lokalisierter Proteine auch durch eine in Abwesenheit von EDTA stabile äußere Zellhülle behindert werden.

Die hohe Empfindlichkeit von C. formicoaceticum gegenüber Lysozym in Abwesenheit von EDTA spricht allerdings dagegen, daß es sich um einen typisch gramnegativen Organismus handelt.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten einen Zellwandaufbau, der weder typische Merkmale einer gramnegativen noch einer grampositiven Zellhülle aufweist (Abb. 24). Die Zellwände von C. kluyveri und einigen anderen Clostridien besitzen eine vergleichbare Struktur (CHO und DOY, 1973; WALTHER-MAURUSCHAT, persönliche Mitteilung).

Bestimmte periphere Proteine, z.B. eine Endonuklease von Escherichia coli (NOSSAL und HEPPEL, 1966), das lösliche Cytochrom $c_3$ und die Hydrogenase von Desulfovibrio gigas (LE GALL et al., 1965; BELL et al., 1974) lassen sich durch mehrmaliges Waschen der Zellen mit einem niedermolaren Puffer solubilisieren. Wiederholtes Waschen ganzer Zellen von C. formicoaceticum mit 20 mM HEPES-KOH-Puffer pH 8, 1mM DTE führte jedoch nicht zur Freisetzung der Fumarat-Reduktase.

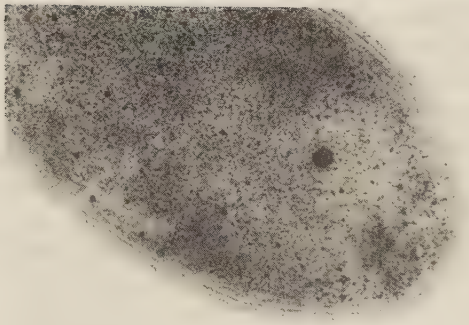


Abb. 24 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Dünnschnittes von C. formicoaceticum A1

Die zur Einbettung verwendeten Zellen waren 19 Stunden auf Fumarat in Gegenwart von Formiat gewachsen. Endvergrößerung x 74 400.

Die mit Hilfe der beschriebenen indirekten Methoden erzielten Ergebnisse, die - unter gewissen Vorbehalten - die Annahme stützen, daß die Fumarat-Reduktase in oder an der Membran lokalisiert sei, lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

a) Die Inkubation ganzer Zellen mit Lysozym in 0,3 M K-Phosphatpuffer (pH 7,6) führte zur Bildung von Sphäroplasten. Nach deren Lyse in 0,15 M Puffer waren 89% der in den Sphäroplasten verbliebenen Fumarat-Reduktase-Aktivität (mit MV) mit den Partikeln verbunden.

b) Bei der Einwirkung von Lysozym auf Zellen in 20 mM HEPES-KOH-Puffer (pH 8), 0,6 M Saccharose wurden über 80% der MV-abhängigen Fumarat-Reduktase freigesetzt. Malat-Enzym und Acetat-Kinase befanden sich überwiegend in der löslichen Fraktion des Extraktes nach Lyse der Sphäroplasten. Fumarat-Reduktase-Aktivität mit $NADH_2$ als Elektronendonator war ausschließlich in den Partikeln nachweisbar.

c) Durch Tris-HCl und EDTA in Gegenwart von Saccharose wurde beim Lysozymaufschluß und beim osmotischen Schock die Permeabilität

der Sphäroplasten bzw. der ganzen Zellen für Malat-Enzym und Acetat-Kinase beträchtlich erhöht. Die Fumarat-Reduktase wurde jedoch schon durch Inkubation der Zellen mit Tris, EDTA und Saccharose im Gegensatz zu den beiden anderen Enzymen weitgehend solubilisiert.

d) Wurden ganze Zellen in HEPES-KOH-Puffer einem osmotischen Schock unterworfen, waren 10% der Gesamtaktivität des Malat-Enzyms und der Acetat-Kinase sowie etwa 25% der Fumarat-Reduktase-Aktivität im Schockpuffer nachzuweisen. Der überwiegende Anteil aller drei Enzyme blieb mit den Zellen verbunden.

## 4. Versuche zum Nachweis einer ATPase-Aktivität in Zellen von C. formicoaceticum

Die meisten bisher bekannten Fumarat-Reduktasen sind wahrscheinlich mit einer Elektronentransport-Phosphorylierung gekoppelt, so z.B. bei Proteus rettgeri (KRÖGER, 1974), Propionibakterien (DE VRIES et al., 1973), Streptococcus faecalis (FAUST und VANDEMARK, 1970), Escherichia coli (MIKI und LIN, 1973; SINGH und BRAGG, 1975), Desulfovibrio gigas (BARTON et al., 1972), Bacteroides spec. (RIZZA et al., 1968; MACY et al., 1975) und Ascaris lumbricoides (REW und SAZ, 1974). Das Vorkommen einer membrangebundenen ATPase in C. formicoaceticum war daher nicht auszuschließen.

Versuche mit Partikelfraktionen bzw. nicht aufgetrennten Rohextrakten nach Lysozymaufschluß zeigten, daß ein geringer extraktabhängiger ATP-Verbrauch stattfand (0,015 - 0,025 E/mg Protein). Der Testansatz enthielt $Ca^{2+}$- oder $Mg^{2+}$-Ionen und 2,4-Dinitrophenol (DNP). Ohne Zusatz von DNP bzw. $Mg^{2+}$ betrug die Aktivität nur 0,003 - 0,004 E/mg Protein.

In der löslichen Fraktion des Extrakts wurde eine geringere Phosphatbildung als in Partikeln gefunden; sie war bei pH 8,5 deutlich höher als bei 7,5 und wurde durch DNP kaum beeinflußt. Es könnte sich hierbei entweder um die Aktivität der solubilisierten ATPase ($BF_1$-Komponente; CLARKE und MORRIS, 1976) oder einer unspezifischen löslichen Phosphatase handeln.

Bestimmungen mit nicht aufgetrennten Rohextrakten verliefen häufig nicht streng linear und zeigten manchmal unbefriedigende Extraktproportionalität. Eine Zunahme von freiem Phosphat war auch in Abwesenheit des ATP-regenerierenden Systems PEP/Pyruvat-Kinase meßbar. Bei der geringen Geschwindigkeit der Reaktion garantierte offenbar die im Ansatz vorhandene ATP-Konzentration (5 mM) Substratsättigung für die Dauer des Tests.

Eine durch DNP stimulierte $Mg^{2+}$, $Ca^{2+}$-abhängige ATPase beschrieben GUARRAIA und PECK (1971) bei Desulfovibrio gigas. RIEBELING et al. (1975) wiesen bei C. pasteurianum eine ATPase nach, deren Funktion die Bildung und Aufrechterhaltung eines pH-Gradienten ist, ohne den ein aktiver Transport nicht stattfindet.

Ob die in Extrakten von C. formicoaceticum gemessene geringe ATPase-Aktivität möglicherweise auch der Energielieferung für den aktiven Transport dient und ob sie mit einer Elektronentransport-Phosphorylierung verbunden ist, bleibt zu prüfen.

5. Nachweis einer alkalischen Phosphatase-Aktivität in Extrakten von C. formicoaceticum

Die alkalische Phosphatase aus Escherichia coli (HEPPEL et al., 1962) und die Pyrophosphatase aus Bacillus megaterium (WEIBULL et al., 1962) hydrolysieren auch ATP. Es war daher nicht auszuschließen, daß die bei pH 8,0 - 8,5 in Rohextrakten gemessene ATPase-Aktivität lediglich auf der hydrolytischen Spaltung des ATP durch eine alkalische Phosphatase beruhte. Mit p-Nitrophenylphosphat wurde die Aktivität dieses Enzyms in Extrakten von C. formicoaceticum bestimmt. Die Hydrolyse des Phosphatesters liefert p-Nitrophenol, das auf Grund seiner Absorption bei 405 nm gemessen werden kann. In Gegenwart von $Mg^{2+}$-Ionen war eine Aktivität von maximal 0,01 E/mg Protein, ohne $Mg^{2+}$ von nur 0,003 - 0,004 E/mg Protein nachzuweisen. Die lösliche Fraktion eines Lysozymextrakts (EII) enthielt verglichen mit dem Sphäroplastenüberstand (EI) und den Partikeln (PII) die höchste Aktivität.

Dennoch ist nicht ganz auszuschließen, daß die beobachtete ATP-Hydrolyse durch die offenbar $Mg^{2+}$-bedürftige unspezifische Phosphatase katalysiert wurde, die möglicherweise mit ATP schneller reagierte als mit dem unphysiologischen p-Nitrophenylphosphat.

6. Nachweis eines Cytochroms in Zellen von C. formicoaceticum

In den meisten anaerob auf Fumarat wachsenden Bakterien wurde ein Cytochrom vom b-Typ gefunden, das am Elektronentransport zwischen Donor und Fumarat beteiligt zu sein scheint, so z.B. bei Bacillus megaterium (KRÖGER und DADAK, 1969), Vibrio succinogenes (JACOBS und WOLIN, 1963a,b), Desulfovibrio gigas (HATCHIKIAN und LE GALL, 1972), Selenomonas ruminantium, Anaerovibrio lipolytica und Veillonella alcalescens (DE VRIES et al., 1974), Propionibacterium arabinosum (SONE, 1974b), Propionibacterium freudenreichii (DE VRIES et al., 1972; DE VRIES et al., 1973) und Bacteroides (WHITE et al., 1962; RIZZA et al., 1968; MACY et al., 1975). Clostridien wurden bislang als Organismen ohne Hämoproteine beschrieben (SMITH und HOBBS, 1974). In C. formicoaceticum und C. thermoaceticum konnte jedoch ein Cytochrom vom b-Typ nachgewiesen werden (GOTTWALD et al., 1975).

Um auszuschließen, daß die morphologisch einheitliche Kultur von C. formicoaceticum mit einem anderen cytochrombildenden Organismus verunreinigt war, wurden mehrfach Verdünnungsreihen in Hochschichtagar mit Fructose hergestellt. Einzelkolonien wurden abgeimpft, pasteurisiert (10 Minuten 80 °C) und wieder zum Beimpfen von Flüssigkeitskulturen mit Fumarat verwendet. Auch in den daraus gewonnenen Zellen war das Cytochrom nachweisbar.

Der neben dem Stamm A1 untersuchte Stamm El Ghazzawi bildete ebenfalls ein Cytochrom, das die gleichen spektralen Eigenschaften aufwies, wie das im Stamm A1 enthaltene Pigment.

Wurden die Zellen mit der French-Presse aufgeschlossen, war ein Teil des Cytochroms in der löslichen Fraktion nachzuweisen. Dagegen befand es sich nach Lysozymaufschluß vollständig in den

Partikeln, was darauf hindeutet, daß es in der Zelle membrangebunden vorlag, durch weniger schonenden Aufschluß jedoch teilweise solubilisiert wurde.

## 6.1. Redox-Differenzspektren bei Raumtemperatur und bei -196 °C

Differenzspektren wurden mit Rohextrakten und Partikelfraktionen von Zellen aufgenommen, die auf Fumarat (oder L-Malat) angezogen worden waren.

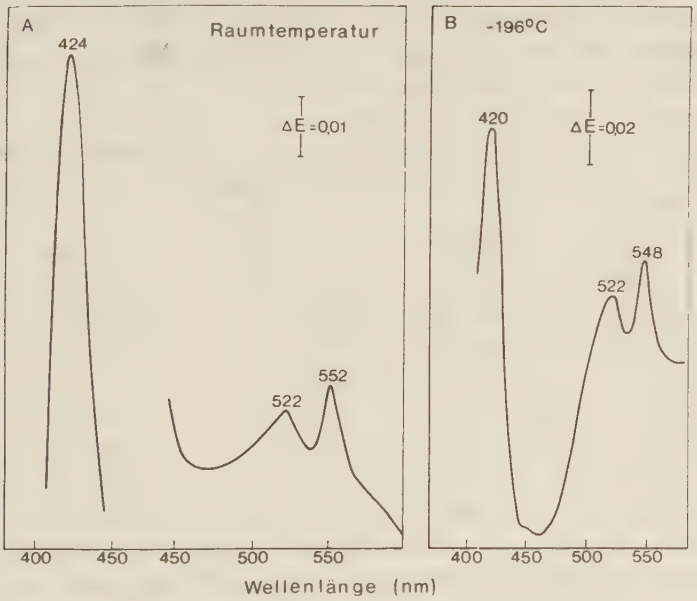



Abb. 25 Redox-Differenzspektren von Partikelsuspensionen bei Raumtemperatur (A) und bei -196 °C (B)

Die zur Extraktherstellung verwendeten Zellen waren 31 Stunden auf Fumarat gewachsen. Die Partikelsuspensionen enthielten 5 mg Protein/ml (Messung bei Raumtemperatur) bzw. 11 mg/ml (Messung bei -196 °C). Die Probelösungen wurden mit einigen Kristallen Na-Dithionit reduziert und jeweils gegen einen luftoxidierten Vergleichsansatz gemessen.

Das in Abb. 25A dargestellte Spektrum wurde bei Raumtemperatur aufgezeichnet. Die α-, β- und γ-Banden lagen bei 552 ± 1 nm bzw. 522 - 525 nm und 424 - 426 nm. Im Spektralbereich zwischen 552 und 700 nm waren keine Absorptionsmaxima zu beobachten. Die Lage der für Cytochrome charakteristischen α-Bande bei 552 nm ließ auf ein Cytochrom c schließen (BARTSCH, 1968; LEMBERG und BARRETT, 1973). Der Soret-(γ-)Peak bakterieller Cytochrome vom c-Typ liegt aber im allgemeinen bei 418 nm, während Cytochrom b eine Bande bei 426 nm aufweist.

Gelegentlich wurde in Partikeln aus C. formicoaceticum bei unveränderten α- und β-Banden ein Doppelpeak bzw. Peak mit ausgeprägter Schulter im Soret-Bereich bei 419 - 420 nm und 426 nm beobachtet (Abb. 26).

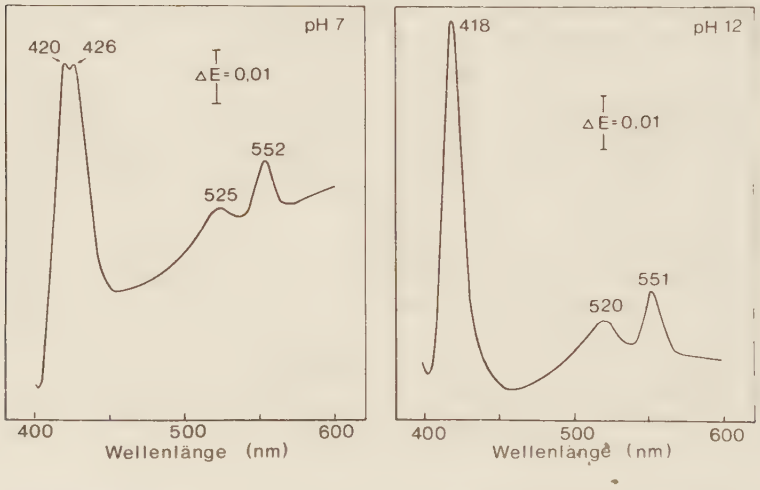



Abb. 26 Redox-Differenzspektren einer Partikelsuspension bei pH 7 und pH 12

Die mit 0,1 M TEA-HCl-Puffer pH 7 verdünnte Partikelsuspension enthielt 2 - 3 mg Protein/ml. Eine luftoxidierte Probe wurde gegen eine mit wenig Dithionit reduzierte gemessen. Mit 10 N NaOH wurde der pH-Wert auf 12 eingestellt.

Wurde der pH-Wert des Ansatzes von 7 auf 12 erhöht, war nur eine Bande ohne Schulter bei 418 nm zu verzeichnen. α- und β-Maximum wurden zu etwas kürzeren Wellenlängen verschoben. Außerdem erfolgte eine leichte Intensivierung der Soret-Bande.

Die Lage des β-Maximums war zuweilen schwer anzugeben, da die Bande nur sehr schwach ausgeprägt war. Zudem beeinträchtigte häufig der hohe Flavingehalt der Extrakte die genaue Bestimmung der Peaklage.

Mit $NADH_2$ als Elektronendonator war auch bei Gegenoxidation mit Kaliumferricyanid nur eine schwache Reduktion des Cytochroms festzustellen. Wurden die Bestimmungen unter anaeroben Bedingungen durchgeführt, war eine deutliche endogene Reduktion der Proben zu beobachten. Belüftung der Vergleichsküvette bewirkte eine Intensivierung der Banden im Differenzspektrum. Formiat und Lactat zeigten keine reduzierende Wirkung.

Abb. 25B zeigt das Tieftemperaturspektrum einer Partikelsuspension. Bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs (-196 $^{o}$C) sind die Schwingungen der Moleküle gedämpft, so daß schärfere Banden erhalten und bei Raumtemperatur nicht erkennbare Doppelpeaks aufgetrennt werden (CHANCE, 1957; LEMBERG und BARRETT, 1973; HAGIHARA et al., 1974). Die Banden im sichtbaren Spektralbereich sind bei -196 $^{o}$C im allgemeinen um 2 - 3 nm zu kürzeren Wellenlängen verschoben. Daher lag das α-Maximum der untersuchten Probe bei 548 nm. β- und γ-Bande befanden sich bei 522 bzw. 420 nm. Im Soret-Bereich war nur ein Peak nachweisbar. Die Lage der α-Bande stimmte mit der anderer Cytochrome c überein (LEMBERG und BARRETT, 1973).

## 6.2. Pyridin-Hämochrom-Spektren

Die Spektren der Pyridin-Ferrohämochrome dienen der Charakterisierung von Cytochromen. In alkalischer Pyridin-Lösung besetzen zwei Moleküle Pyridin die 5. und 6. Koordinationsstelle des Eisens (FALK, 1964). Das Pyridin-Hämochrom-Differenzspektrum von Partikeln aus C. formicoaceticum (Anzucht auf Fumarat) wies

Banden bei 550, 520 und 416 nm auf (Abb. 27). Die Pyridin-Hämochrome von c-Typ-Cytochromen besitzen charakteristische Absorptionsmaxima zwischen 549 und 551 nm. Auch dieses Ergebnis deutete somit darauf hin, daß es sich bei dem in C. formicoaceticum enthaltenen Pigment um ein Cytochrom c handelte.

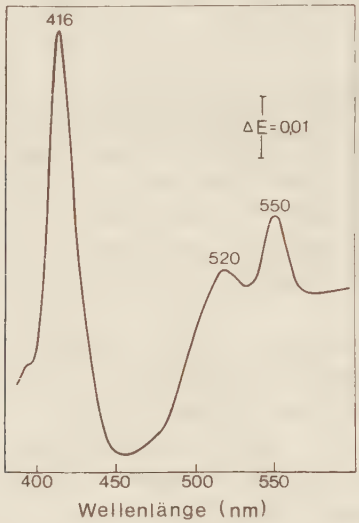



Abb. 27 Pyridin-Hämochrom-Differenzspektrum einer Partikelsuspension

1 ml einer Partikelsuspension (11 mg Protein/ml) wurde abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml alkalischer Pyridin-Lösung aufgenommen (Einzelheiten siehe Methoden). Reduktion erfolgte durch Zusatz von einigen Kristallen Na-Dithionit.

## 6.3. Kohlenmonoxid-Spektren

Verschiedene bakterielle Cytochrome b und c bilden mit CO durch Licht dissoziierbare Komplexe (BARTSCH, 1968; WHITE und SINCLAIR, 1971; LEMBERG und BARRETT, 1973). Die spektralen Eigenschaften

Abb. 29 Pyridin-Hämochrom-Differenzspektrum nach Aceton-HCl-Extraktion

Der zur Extraktion verwendete lyophilisierte Rohextrakt (120 mg Protein) wurde durch French-Press-Aufschluß gewonnen (Extraktionsverfahren siehe Methoden). Der eingeengte Extrakt wurde in 1 ml Pyridin + 1 ml 0,2 N NaOH aufgenommen. Nach Zugabe von Dithionit wurde das Differenzspektrum gegen eine mit einer Spur Kaliumferricyanid oxidierte Probe gemessen.

## 6.5. Bestimmung des Cytochrom-Gehaltes in Partikelfraktionen

Eine genaue Ermittlung des Cytochrom-Gehalts von C. formicoaceticum ist zur Zeit noch nicht möglich, da eine Anreicherung und Charakterisierung des Pigments noch aussteht. Unter der Voraussetzung, daß es sich um ein Cytochrom vom b-Typ handelte, wurden aus den gemessenen Absorptionsdifferenzen $\Delta E_{(552 - 566\ nm)}$ mit Hilfe des von CHANCE und WILLIAMS (1956) angegebenen Extinktionskoeffizienten $\varepsilon = 20\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ die Cytochrom-Gehalte verschiedener Proben berechnet. Nach Anzucht auf Fumarat enthielten die

Partikel 0,04 - 0,13 µmole Cytochrom pro g Protein. In Zellen, die auf L-Malat gewachsen waren, betrug der Gehalt bis zu 0,17 µmole/g Partikelprotein. Die höchsten Werte wurden jeweils beim Wachstum in formiathaltiger Nährlösung erzielt. Mit Fructose angezogene Zellen erreichten höchstens 0,06 µmole/g Protein (Membranfraktion). Auch beim Wachstum auf Lactat wurde das Cytochrom gebildet; lediglich bei Verwertung von Glutamat in einem Komplexmedium war das Pigment nicht nachweisbar. Nach Anzucht in einem Minimalmedium (ANDREESEN, persönliche Mitteilung) mit verschiedenen Substraten (Pyruvat, D-Ribose, L-Glutamat, Gluconat, Glucuronat, Galakturonat) betrug der Cytochrom-Gehalt der Membranen nach Lysozymaufschluß zwischen 0,03 und 0,1 µmole pro g Protein.

Anscheinend wurde das Cytochrom unter allen getesteten Wachstumsbedingungen gebildet. Allerdings war es zuweilen, z.B. bei Fructoseverwertung, bis zum Beginn der stationären Phase entweder gar nicht oder nur in Spuren nachzuweisen. Der Cytochrom-Gehalt stieg jedoch mit zunehmendem Alter der Zellen. Die vermehrte Bildung von Cytochromen während der stationären Phase wurde auch bei anderen Bakterien beobachtet (SMITH, 1954a, b; SPICHER, 1974a). Die Aufklärung der Funktion des Cytochroms in C. formicoaceticum bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

### 6.6. Nachweis eines Cytochroms in Clostridium thermoaceticum

Die Aufzeichnung des Redox-Differenzspektrums eines Rohextrakts von C. thermoaceticum lieferte Banden bei 556, 522 und 422 nm, die auf ein Cytochrom b hinwiesen. Dies konnte durch Aceton-HCl-Extraktion bestätigt werden (GOTTWALD et al., 1975). Die Funktion des Cytochroms in C. thermoaceticum ist unbekannt.

## 7. Nachweis von Menachinon in C. formicoaceticum und C. thermoaceticum

Durch Extraktion von Rohextrakten mit Petroläther nach der von KRÖGER und DADAK (1969) beschriebenen Methode konnten geringe Mengen Menachinon in C. formicoaceticum und C. thermoaceticum nachgewiesen werden (GOTTWALD et al., 1975). Extrakte von C. formicoaceticum enthielten nach Anzucht auf Fumarat 0,03 µmole Menachinon/g Protein; in C. thermoaceticum wurden 0,32 µmole/g Protein gefunden.

Der Menachinon-Gehalt in Membranen anderer Organismen liegt zwischen 4 und 18 µmolen/g Protein (KRÖGER und DADAK, 1969; MAROC et al., 1970; SONE, 1974b; SCHWARTZ und SPORKENBACH, 1975). Bei anderen Clostridien wurden Chinone bisher nicht nachgewiesen.

Nach Extraktion von Partikeln aus C. formicoaceticum mit Petroläther wurden Absorptionsspektren aufgezeichnet. Sie wiesen einen breiten Gipfel zwischen 250 und 265 nm auf. Wie Redox-Differenzspektren zeigten, wurde durch $NaBH_4$ Reduktion erzielt (ohne Abbildung). Die Bande lag ebenfalls zwischen 250 und 265 nm.

Struktur und Funktion der Menachinone von C. formicoaceticum und C. thermoaceticum sind unbekannt.

# III. DISKUSSION

## 1. Vergärung von Fumarat und L-Malat

Zahlreiche anaerobe und fakultativ anaerobe Organismen können durch Vergärung von Fumarat oder Malat allein bzw. erst in Gegenwart eines reduzierten Substrats (Kohlenhydrate, Lactat, Glycerin) Energie gewinnen. Im allgemeinen dienen die $C_4$-Dicarbonsäuren als Akzeptoren für Reduktionsäquivalente, die durch Oxidation eines anderen Substrats verfügbar werden.

Wachsende und ruhende Zellen von Escherichia coli und einigen anderen Organismen verwerten unter anaeroben Bedingungen Glycerin, Lactat, Pyruvat, Formiat, $H_2$ und einige andere Substrate am besten, wenn gleichzeitig Fumarat oder Nitrat als Elektronenakzeptoren vorhanden sind (QUASTEL und STEPHENSON, 1925; QUASTEL et al., 1925; QUASTEL und WOOLDRIDGE, 1929; KREBS, 1937). Auf Glycerin, Lactat und Fumarat als einzelnen Substraten ist dagegen kein oder nur geringes Wachstum zu verzeichnen (QUASTEL et al., 1925; QUASTEL und WOOLDRIDGE, 1929). In Rohextrakten von Escherichia coli konnte die Reduktion von Fumarat bzw. L-Malat durch $H_2$ oder Formiat nachgewiesen werden (LASCELLES und STILL, 1947; GEST, 1952; PECK und GEST, 1954).

Streptococcus faecalis erreicht bei anaerobem Wachstum auf Glucose und Fumarat fast die Ertragskoeffizienten, die bei aerober Glucoseverwertung erzielt werden, da weniger Pyruvat als Elektronenakzeptor benötigt wird und daher als zusätzliche Energiequelle zur Verfügung steht (DEIBEL, 1964; DEIBEL und KVETKAS, 1964). FAUST und VANDEMARK (1970) wiesen außerdem mit der Fumaratreduktion verbundene oxidative Phosphorylierung nach. Fumarat wird quantitativ zu Succinat reduziert. L-Malat kann ebenfalls als H-Donator für Fumarat dienen. Da Streptococcus faecalis die Fumarase fehlt, vermag er aus Malat kein Succinat zu bilden (DEIBEL, 1964; AUE und DEIBEL, 1967).

Milchsäurebakterien wie Lactobacillus plantarum, Lactobacillus casei und Leuconostoc mesenteroides vergären L-Malat allein oder in Gegenwart von Glucose vorwiegend zu Lactat und nicht zu Succinat (KANDLER et al., 1973; SCHÜTZ und RADLER, 1973, 1974).

Anaerobes Wachstum auf Fumarat als einziger C- und Energiequelle wurde bisher nur selten beobachtet. Desulfovibrio gigas und einige Stämme von Desulfovibrio desulfuricans vermögen in sulfatfreiem Medium zu wachsen, indem sie Fumarat oder L-Malat zu Acetat, $CO_2$ und Succinat disproportionieren (MILLER und WAKERLEY, 1966; MILLER et al., 1970). Als H-Donator beim Wachstum auf Fumarat kann Desulfovibrio zusätzlich $H_2$ verwenden (HATCHIKIAN und LE GALL, 1970b, 1972). Der mikroaerophile Vibrio succinogenes benötigt $H_2$ oder Formiat als Elektronendonatoren für die Fumarat- oder Nitratreduktion (WOLIN et al., 1961). Bei diesem Pansenbakterium wurde erstmals die Beteiligung einer Formiat-Dehydrogenase, einer Fumarat-Reduktase und eines Cytochroms b am Elektronentransport vom Formiat zum Fumarat nachgewiesen (JACOBS und WOLIN, 1963a,b).

$C_4$-Dicarbonsäureverwertung wurde bei Clostridien bislang wenig beschrieben. C. acetobutylicum vermag auf Glycerin in Gegenwart von Fumarat zu wachsen (EGOROV et al., 1972). Das thermophile C. tartarivorum benötigt zum Wachstum auf Fumarat und L-Malat zusätzlich Acetat (MERCER und VAUGHN, 1951). Gewaschene Zellen von C. tetanomorphum setzen auch Fumarat und Malat um (WOODS und CLIFTON, 1937). EL GHAZZAWI (1967) und ANDREESEN et al. (1970) beobachteten Wachstum von C. formicoaceticum in einem Komplexmedium, das Fumarat oder Malat enthielt. Der thermophile Homoacetatgärer C. thermoaceticum verwertet weder Fumarat noch L-Malat (ANDREESEN et al., 1973).

Da C. formicoaceticum Fructose überwiegend zu Acetat und $CO_2$ umsetzt, wird der Organismus ebenfalls als Homoacetatgärer bezeichnet (ANDREESEN et al., 1970). Auch bei der Verwertung von Pyruvat und Gluconat wurde als Hauptgärprodukt Acetat gefunden (ANDREESEN, 1969; ANDREESEN et al., 1974). Acetat wird einerseits durch Pyruvatspaltung gebildet. Die daran beteiligten Enzyme Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (KOEPSELL und JOHNSON, 1942; MORTENSON et al.,

1963; UYEDA und RABINOWITZ, 1971), Phosphotransacetylase und Acetat-Kinase wurden in C. formicoaceticum bereits direkt oder indirekt nachgewiesen (LINKE, 1967, 1969a; ANDREESEN et al., 1974). Andererseits werden überschüssige Reduktionsäquivalente zur Acetat-Synthese aus $CO_2$ verwendet (LJUNGDAHL und WOOD, 1969; LJUNGDAHL und ANDREESEN, 1976). Die Enzyme des Homoacetatweges sind auch in C. formicoaceticum vorhanden (ANDREESEN et al., 1974; O'BRIEN und LJUNGDAHL, 1972; SCHULMAN et al., 1972).

Die vorliegenden Untersuchungen zeigten, daß beim Wachstum auf Fumarat und L-Malat im Gegensatz zur Verwertung von Fructose, Pyruvat und Gluconat Acetat nicht das einzige Gärprodukt darstellte, sondern ein Teil des Substrats zu Succinat reduziert wurde. Die Vergärung von Fumarat führte im allgemeinen zu folgender Bilanz:

$$3\ \text{Fumarat} \longrightarrow 2\ \text{Succinat} + 1\ \text{Acetat} + 2\ CO_2$$

Demnach wurde Acetat nur durch Pyruvatspaltung gebildet. Die Disproportionierung von 1,4-$^{14}$C-Fumarat durch nicht wachsende Zellen lieferte praktisch unmarkiertes Acetat. Dieses Ergebnis bestätigte die genannte Gärbilanz.

Unter bestimmten Bedingungen, z.B. in Gegenwart hoher Bicarbonatkonzentrationen war allerdings auch bei Fumaratvergärung die Bildung von Acetat aus $CO_2$ möglich. Die Enzyme des Homoacetatweges waren demzufolge auch beim Wachstum auf Fumarat vorhanden, wurden jedoch nur unter bestimmten, noch nicht genau benennbaren Bedingungen zur $CO_2$-Reduktion genutzt. Bei Vergärung von 1,4-$^{14}$C-Fumarat durch ruhende Zellen in Abwesenheit von Bicarbonat waren nur wenige Prozent der Gesamtradioaktivität im Acetat nachzuweisen, was mit der Reduktion von freigesetztem $^{14}CO_2$ erklärt werden kann. Eine Austauschreaktion zwischen der Carboxylgruppe des Acetats und $CO_2$ wurde bei C. formicoaceticum bisher nicht gefunden (O'BRIEN und LJUNGDAHL, 1972); sie führt dagegen bei C. thermoaceticum zu einem schnellen Ersatz des markierten Carboxyl-Kohlenstoffs in $CH_3{}^{14}COOH$ durch $^{12}CO_2$ (LENTZ und WOOD, 1955).

Während Desulfovibrio gigas Fumarat und L-Malat nach dem gleichen Schema disproportioniert (GROSSMAN und POSTGATE, 1955; MILLER et al., 1970), bildete C. formicoaceticum aus L-Malat unter Wachstums-

und Gärbedingungen zwar die gleichen Produkte wie bei Fumaratvergärung (Acetat, Succinat, $CO_2$), aber in anderen relativ variablen Mengenverhältnissen. Wachsende Zellen vergoren Malat fast vollständig zu Acetat. Succinat wurde nur in geringen Mengen ausgeschieden, obwohl in Extrakten eine hohe Fumarat-Reduktase-Aktivität (mit reduziertem MV als Elektronendonator) nachzuweisen war. Unter reinen Gärbedingungen wurde zuweilen fast so viel Substrat wie bei Fumaratvergärung zu Succinat reduziert.

Die geringen auch beim Wachstum auf L-Malat gebildeten Fumaratmengen genügten möglicherweise, die Fumarat-Reduktase vollständig zu induzieren bzw. zu aktivieren. Dennoch schien diese Reaktion im Gärungsstoffwechsel des Malats keine Bedeutung zu haben. Zum Ausgleich der Redoxbilanzen mußte daher $CO_2$ über den Homoacetatweg reduziert werden. Wenn eine Aktivierung dieser Reaktionsfolge durch L-Malat oder eines seiner Abbauprodukte erfolgte, wäre denkbar, daß die geringe Fumaratreduktion auf dem schnellen Abzug von Reduktionsäquivalenten durch die Acetatsynthese aus $CO_2$ beruhte. Das $NAD/NADH_2$-Verhältnis in der Zelle könnte dabei regulatorische Bedeutung haben (SANWAL, 1970). Bei Vergärung von Malat durch ruhende Zellen nach Anzucht auf dem gleichen Substrat wurde ohne lag-Phase Succinat gebildet. Demnach scheint nicht das Fehlen eines zur Fumaratreduktion notwendigen Enzyms (z.B. Fumarase) oder Cofaktors beim Wachstum auf Malat der Grund für den veränderten Gärverlauf zu sein.

Falls L-Malat der eigentliche Induktor des Malat-Enzyms ist, kann beim Wachstum auf Malat möglicherweise die Decarboxylierung des Substrats zu Pyruvat wesentlich schneller erfolgen als die Umwandlung in Fumarat. Die Malat-Enzyme von Escherichia coli (MURAI et al., 1972), Streptococcus faecalis (LONDON und MEYER, 1969a; SCHÜTZ und RADLER, 1974) und Bacillus subtilis (OHNE, 1975) werden durch Malat induziert. Ebenso ist eine spezifische Aktivierung des Enzyms durch Malat vorstellbar, wie sie z.B. bei Fusarium oxysporum beschrieben wurde (ZINK, 1974). Die spezifische Aktivität des Malat-Enzyms war in Rohextrakten von C. formicoaceticum nach Anzucht auf Malat höchstens drei- bis viermal so hoch wie beim Wachstum auf Fumarat. Ob diese relativ geringe Differenz

für den unterschiedlichen Gärverlauf verantwortlich sein kann, läßt sich an Hand der verfügbaren Daten noch nicht entscheiden.

Da besonders bei anaeroben, im wesentlichen auf Substratphosphorylierung angewiesenen Organismen der Stoffwechsel auf maximale Energiegewinnung ausgerichtet sein müßte, könnte auch der energetische Zustand der Zellen für die Regulation des Gärverlaufs verantwortlich sein. Möglicherweise wird der $C_4$-Dicarbonsäureabbau bei C. formicoaceticum durch den ATP-Gehalt bzw. die "energy charge" der Zelle (ATKINSON, 1966, 1972; CHAPMAN et al., 1971) gesteuert. Sowohl die Fumarase höherer Organismen als auch die Malat-Enzyme einiger Pflanzen und Bakterien werden durch die "energy charge" reguliert (ATKINSON, 1966; COHEN und PENNER, 1965; MACRAE, 1971; DAVIES und PATIL, 1974; OHNE, 1975; SANWAL, 1970).

C. formicoaceticum wächst auf Fructose und Pyruvat nur in Gegenwart von Bicarbonat, das als Elektronenakzeptor benötigt wird (EL GHAZZAWI, 1967; ANDREESEN et al., 1970, 1974). Hingegen erfolgte gutes Wachstum auf Fumarat und L-Malat auch in Abwesenheit von Bicarbonat und Formiat. Das beim Fumaratabbau zu Acetat freigesetzte $CO_2$ wurde entweder gar nicht oder nur zu einem kleinen Teil als Elektronenakzeptor verwendet. Der Ausgleich der Redoxbilanz wurde durch Fumaratreduktion erzielt. Zusatz von Bicarbonat zu einer fumarathaltigen Nährlösung beeinflußte hingegen den Wachstums- und Gärverlauf.

$CO_2$ in Substratmengen fördert das Wachstum verschiedener anaerober Organismen (Bacteroides und andere Pansenbakterien, Actinomyces bovis, Flexibacterium(= Cytophaga) succinicans), indem es einerseits NAD-Regeneration durch Pyruvat-Carboxylierung und anschließende Succinatbildung, andererseits zusätzliche Energiegewinnung (durch Pyruvatspaltung bzw. Elektronentransport-Phosphorylierung) ermöglicht (ANDERSON und ORDAL, 1956; HOBSON und SUMMERS, 1967; BUCHANAN und PINE, 1967; CALDWELL et al.,1969).

Beim Wachstum auf Fumarat in Gegenwart von Bicarbonat versporten die Kulturen von C. formicoaceticum fast vollständig. Sporenbildung setzte schon ein, bevor das Substrat verbraucht war.

Auch verschiedene Bacilli sporulieren unter bestimmten Bedingungen schon während des exponentiellen Wachstums (DAWES und MANDELSTAM, 1970). Bei Bacillus megaterium ist Sporenbildung sogar in Gegenwart von Glucose möglich, wenn Alanin fehlt; andererseits wird aber keine Sporulation induziert, sofern Glutamat oder ein unausgewogenes Verhältnis anderer Aminosäuren das Wachstum begrenzt (GRELET, 1957; HANSON und MacKECHNIE, 1969). Normalerweise reprimiert ein Überschuß an Glucose die Sporulation, so z.B. bei C. thermosaccharolyticum (HSU und ORDAL, 1969). Die Sporenbildung wird durch sehr komplexe Regulationsmechanismen gesteuert. Da diese Zusammenhänge bei C. formicoaceticum bislang nicht untersucht wurden, läßt sich nicht entscheiden, welche Faktoren für die auffallend hohe Sporulationsrate beim Wachstum auf Fumarat in Gegenwart höherer Bicarbonatkonzentrationen (>60 mM) verantwortlich sind.

Bicarbonat bewirkte die vorübergehende Anhäufung von mehr als 20 mM Malat außerhalb der Zellen. Enterobacter aerogenes (=Aerobacter, Klebsiella) häuft ebenfalls beim Wachstum in Gegenwart von Fumarat Malat an (FORGET und PICHINOTY, 1964). Die Akkumulation von Malat außerhalb der Zellen könnte darauf beruhen, daß der weitere Abbau dieses Metaboliten durch Bicarbonat direkt oder indirekt verlangsamt wurde. Es wäre denkbar, daß eine hohe $CO_2$-Konzentration das Gleichgewicht des Malat-Enzyms ungünstig beeinflußt. MATULA et al. (1969) beobachteten bei Micrococcus spec. eine Stimulation der Pyruvat-Carboxylierungsreaktion durch $CO_2$. Diese Gleichgewichtsverschiebung könnte Mangel an Pyruvat oder einer davon abgeleiteten Verbindung (z.B.Alanin) bewirken und Sporulation auslösen. Andererseits könnte Bicarbonat Reaktionen beeinflussen, die Sporulation erst ermöglichen. Bei Bacillus subtilis werden Sporen nur dann gebildet, wenn Gluconeogenese stattfinden kann, da Glucosamin für die Sporenwand benötigt wird (DIESTERHAFT und FREESE, 1973). Außerdem muß auch der Tricarbonsäureabschnitt des Citratzyklus aktiv sein und die Synthese von Glutamat, einem Hauptbestandteil der Sporen, zulassen (OHNE und RUTBERG, 1976). Da die Sporulation Energie benötigt, muß zudem Energieversorgung gewährleistet sein.

Beim Wachstum von C. formicoaceticum auf L-Malat in Gegenwart von Bicarbonat wurde eine wesentlich geringere Wachstumsrate als in Abwesenheit von Bicarbonat beobachtet, aber der Organismus bildete nur gelegentlich einige Sporen. Das könnte auf einen direkten oder indirekten Einfluß höherer L-Malat-Konzentrationen auf die Initiation der Sporenbildung hinweisen. 100 mM L-Malat bewirken bei Bacillus subtilis eine mehr als 15-stündige Verzögerung der Sporulation (OHNE und RUTBERG, 1976). Der tatsächliche Effektor dieser Regulation auf der Ebene der Transkription oder der Translation ist unbekannt.

Die Versuche zur gleichzeitigen Vergärung von Fumarat und Fructose durch C. formicoaceticum wiesen auf komplexe Regulationsmechanismen beim Abbau der beiden Substrate hin. Verwertung von Fumarat erfolgte auch in Abwesenheit von Bicarbonat und in Gegenwart von Formiat, Fructose wurde dagegen unter diesen Bedingungen fast nicht umgesetzt. Enthielt die Nährlösung jedoch Bicarbonat, wurden beide Substrate sehr schnell gleichzeitig vergoren. Katabolit-Repression der $C_4$-Dicarbonsäureverwertung durch Fructose scheint bei C. formicoaceticum allerdings nicht vorzuliegen, da Fumarat auch in Gegenwart des Zuckers umgesetzt werden konnte. Ebenso rufen Intermediärprodukte der Glykolyse offenbar keine Hemmung von Dicarbonsäureaufnahme und -abbau hervor, da diese Regulation auch in Gegenwart von Bicarbonat wirksam werden sollte. Bei Streptococcus faecalis wird die Malatverwertung beim Wachstum auf Glucose oder Fructose gehemmt (CAMPBELL et al., 1943; LONDON und MEYER, 1969a,b; LONDON und MEYER, 1970). Fructose-1,6-bisphosphat und 3-Phosphoglycerinsäure hemmen die Malat-Enzyme von Streptococcus faecalis und Lactobacillus casei (LONDON und MEYER, 1969b; LONDON et al., 1970, 1971).

Die regulatorische Funktion des Bicarbonats bei der gleichzeitigen Vergärung von Fumarat und Fructose durch C. formicoaceticum könnte u.a. in einer spezifischen Wirkung auf Reaktionen des Homoacetatweges bestehen, der für die Verwertung von Fructose benötigt wird (ANDREESEN et al., 1970). Auch beim Wachstum auf Pyruvat ist $CO_2$-Reduktion zu Acetat offenbar erforderlich, obwohl ein Ausgleich der Redoxbilanz theoretisch schon durch Formiatbildung möglich ist.

Ruhende Zellen vergären Pyruvat in Abwesenheit von Bicarbonat ausschließlich zu Acetat, in Gegenwart von Bicarbonat wird auch Formiat gebildet (ANDREESEN et al., 1974).

Eine Regulation der $C_4$-Dicarbonsäureverwertung durch die Aktivität des Homoacetatweges könnte erklären, warum C. formicoaceticum unter Gärbedingungen mehr Malat zu Succinat reduzierte als beim Wachstum. Eine geringe Aktivität der an der $CO_2$-Reduktion zu Acetat beteiligten Enzyme machte möglicherweise den Ausgleich der Redoxbilanz durch Fumarat-Reduktion erforderlich.

Formiat kann anstelle von Bicarbonat bei der Hexosevergärung durch C. formicoaceticum als Elektronenakzeptor eingesetzt werden (ANDREESEN et al., 1970). C. thermoaceticum lieferte bei Xylosevergärung in Gegenwart von Formiat höhere Zellerträge als bei Zusatz von Bicarbonat zum Nährmedium (GOTTWALD, 1973). QUASTEL und WOOLDRIDGE (1929) beobachteten bei Escherichia coli eine deutliche Wachstumssteigerung durch Formiat, wenn Lactat plus Fumarat als Substrate dienten. Sie führten den Einfluß des Formiats einerseits auf die Schaffung eines günstigen Redoxpotentials in der Kultur, andererseits auf zusätzliche Energiegewinnung durch Formiatoxidation zurück.

Formiat übte je nach Substrat unterschiedliche Einflüsse auf das Wachstum von C. formicoaceticum mit $C_4$-Dicarbonsäuren aus. Bei der Vergärung von Fumarat in Gegenwart von Formiat wurden im allgemeinen etwas höhere Dichten ($OD_{600}$ = 1,8 - 2,0) als ohne oder mit Bicarbonat ($OD_{600}$ = 1,5) erzielt, ohne daß Sporen gebildet wurden. Die Verdopplungszeiten in Anwesenheit von Bicarbonat bzw. Formiat unterschieden sich allerdings nicht wesentlich (etwa 4 Stunden). Das Wachstum auf Malat wurde hingegen durch Formiat beschleunigt. Während bei Fumaratverwertung die kürzesten Verdopplungszeiten in Abwesenheit von Bicarbonat beobachtet wurden (2,9 Stunden), erfolgte schnellstes Wachstum auf L-Malat in Gegenwart von Formiat ($t_d$ = 6,9 Stunden). Diente Fumarat als Substrat, wurde beim Wachstum und unter reinen Gärbedingungen die Formiatoxidation mit der Fumaratreduktion gekoppelt. Formiat wurde dagegen von Zellen, die auf Malat wuchsen, zu $CO_2$ und Acetat disproportioniert, da Fumarat

als Elektronenakzeptor nicht gebildet wurde. Vibrio succinogenes verwendet Formiat auch bei Verwertung von L-Malat zur Fumaratreduktion (WOLIN et al., 1961). Wurde Malat durch ruhende Zellen von C. formicoaceticum in Gegenwart von Formiat vergoren, war ein deutlicher Anstieg der Succinatproduktion gegenüber formiatfreien Ansätzen zu verzeichnen. Dies könnte, wie schon die generell erhöhte Succinatbildung bei Malatvergärung durch ruhende Zellen, auf einer zu geringen Aktivität des Homoacetatweges beruhen, die den Ausgleich der Redoxbilanz durch andere Reaktionen erforderlich machte. Eine zu niedrige Aktivität der an der $CO_2$-Reduktion zu Acetat beteiligten Enzyme nehmen auch ANDREESEN et al. (1974) als Grund für die bei der Vergärung von Pyruvat beobachtete Ausscheidung von Formiat in der stationären Phase an.

Reduktion des gesamten eingesetzten Fumarats durch Formiat sowie ausschließliche Acetatbildung aus den Dicarbonsäuren wurde bei C. formicoaceticum nicht beobachtet. Ruhende Zellen verschiedener Stämme von Desulfovibrio desulfuricans setzen Fumarat mit $H_2$ quantitativ zu Succinat um (GROSSMAN und POSTGATE, 1955). Beim anaeroben Wachstum auf Malat in Gegenwart von $H_2$ vergärt Escherichia coli über 90% des Substrats zu Succinat (MACY et al., 1976).

## 2. Energiegewinnung beim anaeroben Wachstum auf Fumarat und L-Malat

Die molaren Ertragskoeffizienten $Y_m$ betrugen beim Wachstum von C. formicoaceticum auf Fumarat 5 - 6 g Trockengewicht/mol Substrat, bei Malatverwertung 7 - 8 g/mol. Nimmt man an, daß beim Fumaratabbau nur durch Substratphosphorylierung im Verlauf der Acetat-Kinase-Reaktion ATP gebildet werden kann, dürfte bei einem Gärverlauf gemäß 3 Fumarat $\longrightarrow$ 2 Succinat + 1 Acetat + 2 $CO_2$ nur 1/3 mol ATP pro 1 mol Fumarat entstehen. Legt man den von BAUCHOP und ELSDEN (1960) angegebenen Energie-Ertragskoeffizienten $Y_{ATP}$ = 10,5 g Trockengewicht/mol ATP zugrunde, dann deuten die erhaltenen Werte auf zusätzliche Energiegewinnung, eventuell durch Elektronentransport-Phosphorylierung hin. Lange Zeit wurde angenommen, daß für einen Organismus experimentell ermittelte $Y_{ATP}$-Werte in gewissen Grenzen als biologische Konstanten anzusehen

seien (BAUCHOP und ELSDEN, 1960; PAYNE, 1970; FORREST und WALKER, 1971). Sie sind jedoch vom Substrat abhängig. STOUTHAMER (1973) gibt folgende Beziehung an:

$$\mu/Y_{ATP} = \mu/Y_{ATP}^{max} + m_e$$

In dieser Gleichung bedeuten: $\mu$ = Wachstumsrate (Std.$^{-1}$), $m_e$ = Energiebetrag, der für die Erhaltung benötigt wird (mole ATP pro g Trockengewicht und Stunde), $Y_{ATP}$ = Energieertragskoeffizient (g Trockengewicht/mol ATP) und $Y_{ATP}^{max} = Y_{ATP}$ korrigiert für den ATP-Bedarf des Erhaltungsstoffwechsels. Der Energiebedarf des Erhaltungsstoffwechsels kann bei verschiedenen Organismen schwanken, so daß sich auch die $Y_{ATP}$-Werte unterscheiden. FORREST und WALKER (1971) sehen eine wesentliche Ursache für unterschiedliche $Y_{ATP}$-Werte in der mehr oder weniger effektiven Kopplung zwischen Katabolismus und Anabolismus. Sie nehmen an, daß diese Kopplung bei anaeroben Organismen wie z.B. Streptococcus faecalis in statischer Kultur optimal ist, wenn ausreichend Nährstoffe vorhanden sind und nur die ATP-Lieferung das Wachstum begrenzt. Zuverlässige Ertragskoeffizienten können nach STOUTHAMER und BETTENHAUSSEN (1973) aus statischen Kulturen nur gewonnen werden, wenn sie bei verschiedenen Wachstumsraten bestimmt werden. Außerdem sollte der Energiebedarf des Erhaltungsstoffwechsels bekannt sein.

Beim Wachstum in komplexen Nährlösungen wurden bisher meist höhere $Y_{ATP}$-Werte gefunden als bei Anzucht in definierten Medien (STOUTHAMER, 1969; DE VRIES et al., 1970; FORREST und WALKER, 1971; DE VRIES et al., 1973; STOUTHAMER und BETTENHAUSSEN, 1972, 1973). Diese Befunde wurden einerseits mit dem geringeren Energiebedarf der Zellsynthese aus vorgefertigten Monomeren, andererseits mit einer Entkopplung von Energieproduktion und Wachstum in Minimalmedien erklärt (DE VRIES et al., 1970; DECKER et al., 1970). In Minimalmedien können Biosynthesereaktionen die Wachstumsgeschwindigkeit bestimmen und zur hydrolytischen Spaltung von überschüssigem ATP führen. Bei Zymomonas mobilis beispielsweise könnte einerseits ein hoher Energiebedarf des Erhaltungsstoffwechsels, andererseit die Entkopplung biosynthetischer Prozesse von der Energielieferung (FORREST und WALKER, 1971; BELAICH et al., 1972) für vergleichsweise niedrige $Y_{ATP}$-Werte verantwortlich sein (STOUTHAMER und BETTENHAUSSEN, 1973). DE VRIES et al. (1970) nehmen an,

daß hohe $Y_{ATP}$-Werte bei Lactobacillus casei auf einer optimalen Kopplung zwischen katabolischen und anabolischen Reaktionen und dem Fehlen einer ATPase in diesem Organismus beruhen.

Die für C. formicoaceticum bei Fumarat- und Malatverwertung in komplexer Nährlösung berechneten Ertragskoeffizienten $Y_m$ sind nur unter gewissen Vorbehalten mit anderen Werten vergleichbar. Substratbegrenzung wird als wichtigste Voraussetzung für die Bestimmung von Ertragskoeffizienten erachtet (STOUTHAMER, 1969; DECKER et al., 1970). Der Einsatz niedriger Substratkonzentrationen in Komplexmedien führte bei C. formicoaceticum zu schwachem, schlecht reproduzierbarem Wachstum. Aus diesem Grunde und da der Organismus nach vollständigem Substratverbrauch meist lysierte, wurden die Werte aus der Trockengewichtszunahme während des Wachstums berechnet (STOUTHAMER, 1969). Das Verhältnis der Gärprodukte zueinander und zum Substratumsatz blieb im gesamten Wachstumsverlauf nahezu konstant. KRÖGER (1974) bestimmte den Ertragskoeffizienten für den fakultativ anaeroben Proteus rettgeri beim anaeroben Wachstum auf Fumarat in gleicher Weise. Der Organismus zeigte ähnlich wie C. formicoaceticum nur einen linearen Wachstumsverlauf.

STOUTHAMER (1973) gibt für das Wachstum auf L-Malat in einem Minimalmedium einen Höchstwert des Energieertragskoeffizienten von $Y_{ATP}^{max}$ = 15,4 g/mol ATP an. Bei Verwertung von Glucose bewirkt der Zusatz von Aminosäuren und Nukleinsäurebasen eine Steigerung des für eine Minimalnährlösung berechneten $Y_{ATP}^{max}$ um ca. 10%. KRÖGER (1974) legte einen $Y_{ATP}^{max}$-Wert von 15,4 auch seiner Berechnung der ATP-Ausbeute beim Wachstum von Proteus rettgeri auf Fumarat zugrunde.

Die Berechnung von $Y_{ATP}$ für C. formicoaceticum aus den molaren Ertragskoeffizienten ergibt Werte um 18 g Trockengewicht/mol ATP unter der Voraussetzung, daß nur 1/3 mol ATP aus Fumarat durch Substratphosphorylierung gebildet wurde. Setzt man die Gültigkeit des genannten $Y_{ATP}^{max}$ voraus, standen der Zelle 0,39 mole ATP pro mol Fumaratumsatz zur Verfügung. Da bei Zusatz von Formiat nur 0,25 mole Acetat/1 mol Fumarat entstanden, ergäbe sich hier

sogar $Y_{ATP}$ = 20 g/mol oder unter Bezug auf $Y_{ATP}^{max}$ n = 0,32 mole ATP pro mol Fumarat. Auf Grund dieser Daten erscheint ATP-Bildung zusätzlich zur Substratphosphorylierung möglich, z.B. durch Elektronentransportphosphorylierung bei der Fumaratreduktion.

Ungewöhnlich hohe Ertragskoeffizienten bei der Vergärung verschiedener Substrate zu Succinat wiesen u.a. auch bei Selenomonas ruminantium (HOBSON und SUMMERS, 1972; DE VRIES et al., 1974), Propionibacterium freudenreichii (DE VRIES et al., 1973), Streptococcus faecalis (SMALLEY et al., 1968), Proteus rettgeri (KRÖGER, 1974), Bacteroides fragilis (MACY et al., 1975) und anderen Pansenbakterien (DE VRIES et al., 1974) auf Elektronentransport-Phosphorylierung im Zusammenhang mit der Fumaratreduktion hin. DE VRIES et al. (1973) nehmen an, daß bei der Fumaratreduktion durch Glycerin-3-Phosphat oder Lactat ($\Delta E_o'$ = 0,22 V; $\Delta G_o'$ = -10 kcal/mol) 1 mol ATP/mol Fumarat und bei der Verwendung von $NADH_2$ als Elektronendonator sogar 2 mole ATP gebildet werden können ($\Delta E_o'$ = 0,35 V; $\Delta G_o'$ = -16 kcal/mol). Bei Eukaryonten wie dem Spulwurm (Ascaris lumbricoides) ist die $NADH_2$-Fumarat-Reduktase-Reaktion nur mit einem Phosphorylierungsschritt (site I der Atmungskette) gekoppelt (REW und SAZ, 1974).

C. formicoaceticum lieferte bei der Vergärung von Fructose relativ hohe $Y_{ATP}$-Werte (14 - 17 g Trockengewicht/mol ATP; ANDREESEN et al., 1970). Da sich bei der Verwertung von Glucose, Fructose und Xylose durch C. thermoaceticum ebenfalls Energieertragskoeffizienten zwischen 13 und 16 g Trockengewicht/mol ATP ergaben, schließen ANDREESEN et al. (1973) und LJUNGDAHL und ANDREESEN (1976) nicht aus, daß durch Homoacetatgärung zusätzliche ATP-Bildung möglich ist. C.aceticum (WIERINGA, 1936, 1940) und der von SCHOBERTH und BALCH (1975) isolierte Organismus, die mit $CO_2$ und $H_2$ wachsen, müßten bei der $CO_2$-Reduktion zu Acetat Energie gewinnen.

Bei der Berechnung von $Y_m$ für C. formicoaceticum ist zu berücksichtigen, daß die Nährlösung Hefeextrakt enthielt. Der Organismus wächst z.B. auch auf Glutamat (ANDREESEN et al., 1970), das nach Analysen der Fa. Difco im Hefeextrakt als vorherrschende

Aminosäure enthalten ist. Es ist daher nicht auszuschließen, daß die Nährlösung eine zusätzliche Energiequelle enthielt, die die höheren Erträge bedingte. Allerdings war mit Hefeextrakt als einziger C- und Energiequelle kein Wachstum zu verzeichnen (ANDREESEN et al., 1970).

Bei Anzucht von C. formicoaceticum auf Malat wurde fast 1 mol Acetat pro 1 mol Substrat durch Pyruvatspaltung gebildet, so daß auch etwa 1 mol ATP zur Verfügung stand. Dem molaren Ertragskoeffizienten von 8 g Trockengewicht/mol Substrat entspräche demnach ein $Y_{ATP}$ von ebenfalls 8 g/mol ATP. Dieser Wert liegt etwas unter dem von BAUCHOP und ELSDEN (1960) angegebenen $Y_{ATP}$ (10,5). Im Vergleich zu dem theoretisch möglichen $Y_{ATP}^{max}$ = 15,4 g/mol ATP (STOUTHAMER, 1973) ist der erhaltene $Y_{ATP}$-Wert jedoch sehr niedrig. Dies könnte auf einem geringen Wirkungsgrad der Malatvergärung, das heißt auf unzureichender Kopplung von Energiegewinnung und Wachstum beruhen (DECKER et al., 1970). Auch die Wachstumsraten waren bei Verwertung von Malat niedriger als bei Fumaratvergärung. Ein Grund dafür könnte sein, daß der Organismus zum Ausgleich der Redoxbilanz die im Vergleich zur Fumaratreduktion energieaufwendigere Acetatsynthese aus $CO_2$ (ca. 1 mol ATP/mol Acetat; LJUNGDAHL und ANDREESEN, 1976) durchführen mußte. Weiterhin wären ein höherer Energiebedarf des Malat-Transports verglichen mit der Fumarat-Aufnahme sowie eine stärkere Entkopplung des Wachstum von der Energiegewinnung als mögliche Ursachen für geringere Wachstumsraten und schlechtere Ausbeuten zu diskutieren.

Voraussetzung für eine zuverlässige Bestimmung der Ertragskoeffizienten $Y_m$ für C. formicoaceticum beim Wachstum auf Fumarat und L-Malat sind Wachstumsexperimente mit einem definierten Medium. Die Ermittlung eines realistischen $Y_{ATP}$-Wertes erfordert außerdem die Aufklärung möglicherweise energieliefernder Reaktionen zusätzlich zur Substratphosphorylierung.

Für den unterschiedlichen Gärverlauf mit Fumarat und L-Malat könnte u.a. auch die verschieden schnelle Aufnahme der beiden Substrate verantwortlich sein. Bei Escherichia coli wird die Aufnahme der $C_4$-Dicarbonsäuren durch Fumarat, Succinat und Malat

induziert (KAY und KORNBERG, 1971; LO et al., 1972). Fumarat besitzt bei Escherichia coli und Rhodopseudomonas sphaeroides die höchste Affinität zu dem Transportsystem (KAY und KORNBERG, 1971; GIBSON, 1975). Hingegen nimmt bei Bacillus subtilis die Affinität zum Carrier in der Reihenfolge L-Malat > Fumarat > Succinat ab (GHEI und KAY, 1973). WILLECKE und LANGE (1974) erhielten Hinweise darauf, daß ein Stamm von Bacillus subtilis zwei unterschiedlich regulierte Malat-Transport-Systeme besitzt.

Der Dicarbonsäure-Transport unterliegt bei den meisten bisher darauf hin untersuchten Organismen der Katabolit-Repression durch Glucose oder Fructose, so z.B. bei Escherichia coli (KAY und KORNBERG, 1971; LO et al., 1972), Bacillus subtilis (FOURNIER et al., 1972; GHEI und KAY, 1973), Pseudomonas putida (DUBLER et al., 1974), Pseudomonas spec. (MATIN und KONINGS, 1972) und Streptococcus faecalis (LONDON und MEYER, 1970). Der Transport von Fumarat scheint dagegen bei C. formicoaceticum durch Fructose nicht reprimiert zu werden, da die Verwertung der Säure auch in Gegenwart des Zuckers möglich war.

Die $C_4$-Dicarbonsäuren gelangen unverändert in die Zellen oder Membranvesikel und werden im allgemeinen angehäuft (LO et al., 1972; DUBLER et al., 1974; BISSHOP et al., 1975). In einigen Fällen begrenzte allerdings der weitere Umsatz des Substrats die Aufnahmerate und verhinderte eine Akkumulation (KAY und KORNBERG, 1971; FOURNIER et al., 1972). Dicarbonsäuren werden wahrscheinlich als Anionen transportiert (GHEI und KAY, 1973). Die Aufnahme ist bei allen bislang getesteten Organismen energieabhängig (KAY und KORNBERG, 1971; RAYMAN et al., 1972; DUBLER et al., 1974; BISSHOP et al., 1975). Die Zelle muß etwa 1 mol ATP aufwenden, um 1 mol Malat zu transportieren (STOUTHAMER, 1973). Unter aeroben Bedingungen scheint ATP jedoch keine Bedeutung als energieliferndes Substrat für den aktiven Transport zu haben (KONINGS und KABACK, 1973). Anaerober Transport erfordert - zumindest bei Escherichia coli - entweder Elektronentransport mit Fumarat oder Nitrat als terminalen Akzeptoren (KONINGS und KABACK, 1973; ROSENBERG et al., 1975; SINGH und BRAGG, 1976) oder ATP, dessen Verwertung von der Funktionsfähigkeit einer ATPase abhängt (LIEBERMAN und HONG, 1974;

GUTOWSKI und ROSENBERG, 1976). Für den Transport einiger Substrate wird eine direkte Kopplung mit der Substratphosphorylierung diskutiert (RAE und STRICKLAND, 1975; GUTOWSKI und ROSENBERG, 1976). Der Kopplungsmechanismus zwischen Energielieferung und Transport bei C. formicoaceticum ist bislang unbekannt. In Gegenwart von Fumarat könnte wie bei Escherichia coli (SINGH und BRAGG, 1976) anaerober Elektronentransport zur Energieversorgung des aktiven Transports beitragen. Beim Wachstum auf L-Malat und anderen Substraten fand jedoch nennenswerte Fumaratreduktion nicht statt. Da Hinweise auf das Vorkommen einer ATPase in C. formicoaceticum vorliegen, erscheint es möglich, daß ATP als energielieferndes Substrat für den aktiven Transport verwendet wird.

Eine bei C. pasteurianum nachgewiesene ATPase erfüllt primär die Funktion, einen pH-Gradienten zwischen dem Zellinnern und dem Medium aufrechtzuerhalten, der für Transportprozesse notwendig ist (RIEBELING et al., 1975; BOOTH und MORRIS, 1975; CLARKE und MORRIS, 1975, 1976). Der Entkoppler Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP) und der ATPase-Hemmstoff Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) hemmen das Wachstum, da sie den pH-Gradienten zusammenbrechen lassen (RIEBELING et al., 1975). Streptococcus faecalis benötigt die Energie der ATP-Hydrolyse zum Aufbau eines Membranpotentials (HAROLD et al.,1970). RIEBELING et al. (1975) sehen in der ATP-Spaltung die Hauptfunktion der ATPase anaerober Organismen. Sie ist notwendig zur Energieversorgung wichtiger Membranprozesse, z.B. der Geißelbewegung, der ATP-abhängigen Transhydrogenierung und des aktiven Transports (MALONEY und WILSON, 1976). An aus Streptococcus lactis isolierten Membranen konnte jedoch bei ausreichender Potentialdifferenz (mindestens 215 mV) auch ATP-Synthese beobachtet werden (MALONEY und WILSON, 1976). Es ist demnach nicht auszuschließen, daß auch streng anaerobe Organismen wie die Clostridien in vivo ein durch Elektronentransport aufgebautes Membranpotential bzw. einen pH-Gradienten zur Energiegewinnung mit Hilfe einer ATPase nutzen können.

Die in Desulfovibrio gigas nachgewiesene, durch DNP stimulierte ATPase (GUARRAIA und PECK, 1971) dient wahrscheinlich der ATP-Bildung beim Elektronentransport (PECK, 1966; BARTON et al.,1972).

Bakterielle ATPasen, die mit der oxidativen Phosphorylierung gekoppelt sind, werden im allgemeinen durch DNP nicht beeinflußt oder sogar gehemmt (BRODIE, 1959; BRAGG und HOU, 1968; GROSS und COLES, 1968; EVANS, 1969; ADAPOE und SILVER, 1975). Hingegen aktiviert DNP die an der bakteriellen Photophosphorylierung beteiligten ATPasen (HORIO et al., 1965; HORIUTI et al., 1968). Die in den Mitochondrien höherer Organismen nachgewiesenen ATPasen werden ebenfalls häufig durch DNP stimuliert (PULLMAN et al., 1960; PULLMAN und SCHATZ, 1967; AMONS et al., 1968). Ob auch die in C. formicoaceticum nachweisbare ATPase-Aktivität mit Elektronentransport-Phosphorylierung verbunden ist oder ob das Enzym eine Funktion beim aktiven Transport erfüllt, kann noch nicht entschieden werden. Die deutliche Abhängigkeit von $Mg^{2+}$- oder $Ca^{2+}$-Ionen sowie die Stimulation durch DNP deuten auf ein Enzym hin, das dem in Desulfovibrio gigas nachgewiesenen ähnlich ist.

Die leicht solubilisierbare Komponente der bakteriellen ATPase ($BF_1$) besitzt auch nach der Ablösung von der Membran noch ATPase-Aktivität (WEST, 1974). Die in der löslichen Extraktfraktion von C. formicoaceticum meßbare geringe Aktivität war allerdings durch DNP nicht zu beeinflussen. Da jedoch in Extrakten eine geringe Phosphatase-Aktivität mit p-Nitrophenylphosphat zu verzeichnen war, besteht die Möglichkeit, daß die beobachtete ATP-Hydrolyse lediglich auf der Aktivität einer unspezifischen alkalischen Phosphatase beruhte. Die Zn- oder Co-abhängige alkalische Phosphatase von Bacillus subtilis ist sowohl in der löslichen als auch in der Partikelfraktion nachzuweisen (GHOSH et al., 1971; YOSHIZUMI und COLEMAN, 1974). Gramnegative Organismen wie Escherichia coli besitzen periplasmatische alkalische Phosphatasen, die auch ATP hydrolysieren (MALAMY und HORECKER, 1961; HEPPEL et al., 1962; HEPPEL, 1971).

Die $Na^+,K^+$-abhängigen Ionentransport-ATPasen höherer Organismen weisen auch p-Nitrophenylphosphatase-Aktivität auf (TOWLE und COPENHAVER, 1970; SCHWARTZ et al., 1972; HOBBS und DE WEER, 1976). In Escherichia coli wurde $Na^+,K^+$-ATPase-Aktivität neben einer $Mg^{2+}$-ATPase gefunden (HAFKENSCHEID und BONTING, 1969). Die ATPase von Streptococcus faecalis ist an der $K^+$-Aufnahme beteiligt (BRAUN

und HANTKE, 1974).

STADTMAN (1959) wies in Extrakten von C. sticklandii eine Phosphatase nach, die p-Nitrophenylphosphat, aber nicht ATP hydrolysiert und durch Menadion und ein Thiol aktiviert wird. Sie schrieb diesem Enzym, das nicht $Mg^{2+}$-abhängig ist, eine Funktion bei der Elektronentransport-Phosphorylierung durch das Glycin-Reduktase-System (STADTMAN et al., 1958; STADTMAN, 1966) zu. Das natürliche Substrat dieser Phosphatase ist unbekannt. In bestimmten Präparationen von C. sticklandii war außerdem ATP- und Pyrophosphat-Hydrolyse-Aktivität zu verzeichnen, die $Mg^{2+}$ und eine SH-Verbindung benötigte (STADTMAN, 1959). Ob eines der genannten Enzyme für die vorwiegend lösliche Phosphatase-Aktivität in Extrakten von C. formicoaceticum verantwortlich ist, muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

3. Fumarat-Reduktase

Membrangebundene Enzyme, die Fumarat zu Succinat reduzieren, wurden in zahlreichen Eukaryonten und Bakterien gefunden. MASSEY und SINGER (1957) untersuchten die Fumarat-Reduktase-Aktivität der Succinat-Dehydrogenase aus Rinderherz. Die Geschwindigkeit der Fumaratreduktion betrug nur 11% der Succinatoxidationsaktivität. KOVAC (1958) stellte fest, daß auch die pflanzliche Succinat-Dehydrogenase Fumarat-Reduktase-Aktivität aufwies. Die Bedeutung des Fumarats als H-Akzeptor und die untergeordnete Rolle der Succinat-Dehydrogenierung bei der Substratoxidation durch fakultativ und strikt anaerobe Bakterien, wie z.B. Veillonella alcalescens, betonten PECK et al. (1957). Die Fumarat-Reduktase aus diesem Organismus katalysiert die Fumaratreduktion (mit reduziertem MV) mindestens dreißigmal schneller als die Succinatoxidation und wird nicht wie die Succinat-Dehydrogenase höherer Organismen durch Succinat und Malonat gehemmt (WARRINGA et al., 1958; WARRINGA und GIUDITTA, 1958). HIRSCH et al. (1963) wiesen erstmals bei einer Mutante von Escherichia coli ohne Succinat-Dehydrogenase eine von diesem Enzym verschiedene Fumarat-Reduktase nach. Aus anaeroben Zellen und atmungsgeschädigten petite-Mutanten von Saccharomyces

wurden verschiedene Fumarat-Reduktasen isoliert, die nicht mit der Succinat-Dehydrogenase identisch sind (SINGER und HAUBER, 1965; HAUBER und SINGER, 1967; TISDALE et al., 1968). Ein Vergleich zwischen Succinat-Dehydrogenasen und Fumarat-Reduktasen von Eukaryonten und Bakterien findet sich bei SINGER et al. (1973).

Fumarat-Reduktase-Aktivität wurde in zahlreichen anaeroben oder fakultativ anaeroben Bakterien nachgewiesen, so z.B. in Pansenbakterien wie Ruminococcus flavefaciens, Bacteroides succinogenes, Bacteroides amylophila, Selenomonas ruminantium, Butyrivibrio fibrisolvens (JOYNER und BALDWIN, 1966), Bacteroides spec. (WHITE et al., 1962; RIZZA et al., 1968; MACY et al., 1975), Vibrio succinogenes (WOLIN et al., 1961; JACOBS und WOLIN, 1963a,b), Streptococcus faecalis (AUE und DEIBEL, 1967), Propionibakterien (DE VRIES et al., 1973; SONE, 1972; SCHWARTZ und SPORKENBACH, 1975), Desulfovibrio gigas (HATCHIKIAN und LE GALL, 1970b), Enterobacter aerogenes (PICHINOTY et al., 1965), Proteus rettgeri (KRÖGER, 1974), Haemophilus parainfluenzae (SINCLAIR und WHITE, 1970), Rhodospirillum rubrum (BOSE und GEST, 1962; GEST, 1972) und Rhodopseudomonas palustris (QADRI und HOARE, 1968). Fumarat kann jedoch auch von den aeroben Bakterien Bacillus megaterium (KRÖGER und DADAK, 1969) und Mycobacterium phlei (BOGIN et al., 1969) unter anaeroben Bedingungen als Elektronenakzeptor verwendet werden.

Die meisten der genannten Organismen reduzieren Fumarat mit $NADH_2$ als Elektronendonator, z.B. Streptococcus faecalis (AUE und DEIBEL, 1967; FAUST und VANDEMARK, 1970), Bacteroides (WHITE et al., 1962; RIZZA et al., 1968; MACY et al., 1975), Escherichia coli (SINGH und BRAGG, 1975; HADDOCK und KENDALL-TOBIAS, 1975) sowie Propionibakterien und strikt anaerobe Pansenbakterien (SONE, 1972,1974b; DE VRIES et al., 1973, 1974; SCHWARTZ und SPORKENBACH, 1975). Escherichia coli und Proteus rettgeri dient außer $NADH_2$ auch Formiat als Elektronendonator (KRÖGER, 1974; HADDOCK und KENDALL-TOBIAS, 1975). Vibrio succinogenes und phototrophe Bakterien besitzen ein Carrier-System, das Elektronen von Formiat oder $H_2$ auf Fumarat überträgt (WOLIN et al., 1961; JACOBS und WOLIN, 1963a; GEST, 1954, 1972; BOSE und GEST, 1962; QADRI und HOARE, 1968). Bei Escherichia coli wurde Fumaratreduktion durch $H_2$ von

LASCELLES und STILL (1947), PECK und GEST (1954) und MACY et al. (1976) beschrieben. Das $H_2$-Fumarat-Reduktase-System wurde außerdem auch bei Desulfovibrio gigas untersucht (HATCHIKIAN und LE GALL, 1970b, 1972). Extrakte von diesem Organismus katalysieren auch die Elektronenübertragung von Pyruvat auf Fumarat (HATCHIKIAN und LE GALL, 1970b; BARTON und PECK, 1971). Bei Propionsäure ausscheidenden Gärorganismen kann Lactat oder Pyruvat der H-Donator für die Fumarat-Reduktase sein (SONE, 1972, 1974b; DE VRIES et al., 1974; SCHWARTZ und SPORKENBACH, 1975). Escherichia coli, Selenomonas ruminantium, Propionibakterien, Bacillus megaterium und einige andere Organismen führen auch einen Elektronentransport vom Glycerin-3-Phosphat zum Fumarat durch (MIKI und LIN, 1973, 1975; DE VRIES et al., 1973, 1974; SONE, 1972, 1974b; KRÖGER und DADAK, 1969). Von den Eukaryonten, bei denen Fumaratreduktion unter anaeroben Bedingungen physiologische Bedeutung besitzt, wird nur $NADH_2$ als Elektronendonator verwendet (AWAPARA und SIMPSON, 1967; GILLES, 1970; REW und SAZ, 1974; OWEN und HOCHACHKA, 1974).

Die bislang beschriebenen Fumarat-Reduktasen von Hefen sind Flavoproteine (Molekulargewicht 33 000 bis 112 000 Dalton), die FAD, Nicht-Häm-Eisen und evtl. Cu enthalten (SINGER und HAUBER, 1965; HAUBER und SINGER, 1967; TISDALE et al., 1968). Auch die Enzyme aus Ascaris-Sarcosomen (= unvollständige Mitochondrien) sowie aus Rinderherz-Mitochondrien enthalten Flavin (REW und SAZ, 1974; HAAS, 1964). Am energieliefernden Elektronentransport zwischen $NADH_2$ und Fumarat ist wahrscheinlich Cytochrom b beteiligt (WILSON und CASCARANO, 1970). FAD und Nicht-Häm-Eisen wurden auch als enzymgebundene Komponenten der Fumarat-Reduktase von Veillonella alcalescens (minimales Molekulargewicht 460 000 Dalton) nachgewiesen (WARRINGA und GIUDITTA, 1958; WARRINGA et al., 1958). Bei anderen Bakterien sind ebenfalls Flavin und Nicht-Häm-Eisen als Bestandteile der primären Dehydrogenasen am Elektronentransport zwischen $NADH_2$ und Fumarat beteiligt, so z.B. bei Streptococcus faecalis (AUE und DEIBEL, 1967; FAUST und VANDEMARK, 1970), Bacteroides ruminicola und Bacteroides melaninogenicus (WHITE et al., 1962; RIZZA et al., 1968) und Propionibacterium arabinosum (SONE, 1972, 1974b). Auch die lösliche NAD-unabhängige Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase von Escherichia coli, die mit dem

anaeroben Elektronentransport gekoppelt ist, ist ein Flavoprotein (KISTLER und LIN, 1972). An der Fumaratreduktion durch $H_2$ oder Formiat scheinen bei Vibrio succinogenes (JACOBS und WOLIN, 1963a, 1963b) und bei Desulfovibrio gigas (HATCHIKIAN und LE GALL, 1970b, 1972; HATCHIKIAN, 1974) weder Pyridinnukleotide noch Flavine beteiligt zu sein. Cytochrom b und Menachinon sind wichtige Komponenten der Fumarat-Reduktase-Systeme von Bacillus megaterium (KRÖGER und DADAK, 1969), Propionibacterium arabinosum (SONE, 1972, 1974b), Propionibacterium freudenreichii (DE VRIES et al., 1973) und Desulfovibrio gigas (HATCHIKIAN und LE GALL, 1972; HATCHIKIAN, 1974). Die Funktion der $H_2$-Fumarat-Reduktase von Desulfovibrio erfordert möglicherweise zusätzlich Cytochrom $c_3$ (DER VARTANIAN und LE GALL, 1974).

Bei Vibrio succinogenes, Selenomonas ruminantium, Anaerovibrio lipolytica und Veillonella alcalescens wurde bislang nur ein Cytochrom b als Elektronenüberträger bei der Fumaratreduktion nachgewiesen (WOLIN et al., 1961; JACOBS und WOLIN, 1963a, b; DE VRIES et al., 1974). Ebenso scheint ein Cytochrom b funktioneller Bestandteil des Fumarat-Reduktase-Systems von Bacteroides ruminicola (WHITE et al., 1962) und Bacteroides fragilis (MACY et al., 1975) zu sein. Hingegen fanden RIZZA et al. (1968) in einem Stamm von Bacteroides melaninogenicus nur ein Cytochrom c sowie ein CO-bindendes Pigment.

Sowohl Veillonella als auch Bacteroides enthalten Menachinone (GIBBONS und ENGLE, 1964). Bei Proteus rettgeri scheint am Elektronentransport zwischen $NADH_2$ und Fumarat kein Cytochrom, sondern nur ein Menachinon beteiligt zu sein (KRÖGER et al., 1971). Ebenso fanden SINGH und BRAGG (1975) Fumarat-Reduktase-Aktivität mit $NADH_2$ und Glycerin-3-Phosphat in einer Mutante von Escherichia coli, die kein Cytochrom bilden kann, aber Menachinon besitzt. Sie stellten allerdings fest, daß energetische Kopplung der Fumaratreduktion mit dem aktiven Transport nur in Gegenwart eines Cytochroms b möglich ist (SINGH und BRAGG, 1976). In Propionibacterium shermanii und Streptococcus faecalis scheint ebenfalls kein Cytochrom, sondern nur ein Menachinon bei der Fumaratreduktion eine Rolle zu spielen (SCHWARTZ und SPORKENBACH, 1975; AUE und DEIBEL,

1967). Naphthochinone wurden aus beiden Organismen bereits isoliert (SCHWARTZ, 1973; BAUM und DOLIN, 1965). Streptococcus faecalis kann im Gegensatz zu den Propionibakterien Cytochrome nur in Gegenwart von Hämin und auch dann nur unter aeroben Bedingungen synthetisieren (BRYAN-JONES und WHITTENBURY, 1969; RITCHEY und SEELEY, 1974).

Die Fumaratreduktion erfüllt bei verschiedenen Organismen unterschiedliche Funktionen. Fakultativ anaeroben Organismen wie Haemophilus parainfluenzae (WHITE, 1966), Streptococcus faecalis (DEIBEL und KVETKAS, 1964) und Actinomyces bovis (BUCHANAN und PINE, 1967) dient das System beim Wachstum auf Glucose unter anderem zur NAD-Regeneration. Von den genannten Organismen kann zumindest Streptococcus faecalis durch Elektronentransport-Phosphorylierung bei der Fumaratreduktion Energie gewinnen (FAUST und VANDEMARK, 1970). Schon SMALLEY et al. (1968) hatten auf Grund hoher Ertragskoeffizienten für Streptococcus faecalis und Streptococcus agalactiae eine Kopplung der Fumaratreduktion mit ATP-Bildung angenommen. Außer bei Streptococcus faecalis wurde Elektronentransport-Phosphorylierung auch bei Desulfovibrio gigas direkt gemessen (BARTON et al., 1970, 1972; BARTON und PECK, 1971). Für das $H_2$-Fumarat-Reduktase-System in diesem Organismus wurden $p/H_2$-Werte zwischen 0,2 und 0,5 mole ATP/mol $H_2$ bestimmt. Diese Reaktion ($\Delta G_0' = -20,6$ kcal/mol) erlaubt theoretisch die Bildung von 1 - 2 molen ATP/mol $H_2$ (BARTON et al., 1970). MIKI und LIN (1973, 1975) wiesen bei Escherichia coli Phosphorylierung durch Elektronentransport vom Glycerin-3-Phosphat zum Fumarat nach. Die Annahme einer mit der Fumaratreduktion verbundenen Elektronentransport-Phosphorylierung bei Propionibakterien, Selenomonas ruminantium und Bacteroides fragilis gründet sich auf die Bestimmung ungewöhnlich hoher Ertragskoeffizienten (DE VRIES et al., 1973; HOBSON und SUMMERS, 1972; MACY et al., 1975).

Die Fumarat-Reduktase spielt auch bei Eukaryonten unter Sauerstoffmangel eine Rolle als energielieferndes System. Ascaris lumbricoides und andere Wirbellose reoxidieren unter anaeroben Bedingungen $NADH_2$ durch Fumaratreduktion und gewinnen Energie durch damit gekoppelte Elektronentransport-Phosphorylierung

(SEIDMAN und ENTNER, 1961; KMETEC und BUEDING, 1961; AWAPARA und SIMPSON, 1967; GILLES, 1970; REW und SAZ, 1974). Sogar in bestimmten Säugetiergeweben dient die Fumaratreduktion der ATP-Bildung, wenn z.B. auf Grund von $O_2$-Mangel (Delphin-Muskel) oder künstlicher Hemmung durch $CN^-$ (submitochondriale Partikel aus Rattenherz, -leber) durch Atmung keine Energiegewinnung möglich ist (OWEN und HOCHACHKA, 1974; WILSON und CASCARANO, 1970; SANADI und FLUHARTY, 1963). Eine mit site I-Phosphorylierung gekoppelte $NADH_2$-Fumarat-Oxidoreduktase wurde auch in intakten Rinderherzmitochondrien nachgewiesen (HAAS, 1964).

Bei anaeroben Organismen, die keinen vollständigen Tricarbonsäure-Zyklus besitzen, muß Fumaratreduktion stattfinden, um Succinat bzw. Succinyl-CoA für Biosynthesen (Häm, Vitamin $B_{12}$) zur Verfügung zu stellen.

C. formicoaceticum enthielt beim Wachstum auf Fumarat und L-Malat eine aktive Fumarat-Reduktase. Allerdings war mit MV als Elektronendonator auch in Zellen nach Anzucht auf Fructose Aktivität nachzuweisen; das Enzym schien hier jedoch nur eine anabolische Funktion zu erfüllen, da Succinat nicht ausgeschieden wurde. Die Fumarat-Reduktasen von Escherichia coli und Streptococcus faecalis werden nicht durch Fumarat induziert (SPENCER und GUEST, 1973; AUE und DEIBEL, 1967).

Succinat-Dehydrogenase-Aktivität konnte in Extrakten von C. formicoaceticum mit den üblichen Elektronenakzeptoren Dichlorphenolindophenol, Phenazinmethosulfat oder K-Ferricyanid nicht nachgewiesen werden. Auch Triphenyltetrazoliumchlorid wurde durch Succinat nicht reduziert. Die Fumarat-Reduktase von Vibrio succinogenes oxidiert Succinat nur in Gegenwart von Tetrazoliumsalzen (JACOBS und WOLIN, 1963a). Andere Fumarat-Reduktasen katalysieren die Succinat-Dehydrogenierung entweder sehr langsam oder überhaupt nicht (PECK und GEST, 1954; PECK et al., 1957; WARRINGA et al., 1958; AUE und DEIBEL, 1967; HAUBER und SINGER, 1967). Das Verhältnis von Succinat-Dehydrogenase- zu Fumarat-Reduktase-Aktivität liegt bei strikt anaeroben Pansenbakterien zwischen 2 : 1000 und 78 : 100 (JOYNER und BALDWIN, 1966).

Die Fumarat-Reduktase-Aktivität in Extrakten von C. formicoaceticum konnte sowohl mit $FMNH_2$ als auch mit reduziertem MV gemessen werden; allerdings verlief die Reaktion mit MV wesentlich schneller als mit FMN. In Partikelpräparationen junger Zellen war eine schwache $NADH_2$-Fumarat-Oxidoreduktase-Aktivität nachweisbar (0,02 - 0,03 E/mg Protein). Die feste Bindung dieser Aktivität an die Membranen weist auf die Beteiligung membrangebundener Carrier (z.B. Cytochrom, Chinon, Nicht-Häm-Eisen) hin. Membranen einer Cytochrom-Mangel-Mutante von Escherichia coli und Partikel des ebenfalls (in Abwesenheit von Hämin) keine Cytochrome enthaltenden Streptococcus faecalis (DEIBEL, 1964) zeigten ähnlich geringe spezifische Aktivitäten dieser Reaktion (0,036 bzw. 0,044 E/mg Protein; FAUST und VANDEMARK, 1970; SINGH und BRAGG, 1975).

Die Nitrat-Reduktase von Staphylococcus aureus zeigt ebenfalls im membrangebundenen und solubilisierten Zustand jeweils unterschiedliche Spezifität. Während über 50% der mit BV meßbaren Aktivität in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden können, findet Nitratreduktion mit Lactat als Elektronendonator nur an den Membranen statt (BURKE und LASCELLES, 1975).

Die niedrige Aktivität der Fumarat-Reduktase von C. formicoaceticum mit $NADH_2$ ging sehr schnell verloren, die Aktivität mit reduziertem MV war dagegen relativ stabil und wenig empfindlich gegenüber Sauerstoff sowie wiederholtem Einfrieren und Auftauen. Auch die von den Membranen abgelöste Nitrat-Reduktase von Rhizobium japonicum, die MV als Elektronenüberträger benötigt, wird im Gegensatz zu dem gebundenen Enzym durch $O_2$ praktisch nicht inaktiviert (KENNEDY et al., 1975). Die normalerweise fest mit der Membran verbundene Fumarat-Reduktase-Aktivität von Desulfovibrio gigas wird hingegen durch Solubilisierung vollständig zerstört (HATCHIKIAN und LE GALL, 1970b).

Formiat konnte der Fumarat-Reduktase von C. formicoaceticum in nicht aufgetrennten Extrakten ebenfalls als Elektronendonator dienen. Die Aktivität wurde durch Zusatz von MV erheblich gesteigert. MV bewirkt einen mehr als zweifachen Anstieg der partikel-

gebundenen $H_2$-Fumarat-Reduktase-Aktivität von Desulfovibrio gigas (HATCHIKIAN und LE GALL, 1970b).

Ein Grund für die Beschleunigung komplexer Redoxreaktionen durch MV dürfte sein, daß der unphysiologische Elektronendonator unter Umgehung membrangebundener Komponenten des Elektronentransport-Systems direkt mit dem Akzeptorprotein, z.B. der Fumarat-Reduktase reagieren kann. Verschiedene andere Enzyme weisen in vitro ebenfalls mit MV höhere Aktivitäten auf als mit den physiologischen Carriern. So zeigt z.B. die Formiat-Dehydrogenase von C. thermoaceticum mit MV eine schnellere Reaktion als mit NADP (ANDREESEN und LJUNGDAHL, 1974). Die Nitrat-Reduktase von Escherichia coli benötigt kein Cytochrom b, wenn MV als Elektronenüberträger dient (CLEGG, 1975). Viologene können die Funktion des Cytochroms $c_3$ in Desulfovibrio desulfuricans übernehmen (POSTGATE, 1956). Bei Rhodopseudomonas palustris ist eine Kopplung der Formiat-Dehydrogenase und der Hydrogenase mit der Fumarat-Reduktase in vitro nur in Gegenwart katalytischer Mengen BV möglich (QADRI und HOARE, 1968).

Die an der Fumaratreduktion durch Formiat beteiligte Formiat-Dehydrogenase scheint bei C. formicoaceticum weitgehend löslich zu sein. Auch die mit dem Elektronentransport verbundene Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase von Escherichia coli ist ein lösliches Enzym (KISTLER und LIN, 1972). Der physiologische Elektronendonator bzw. -akzeptor der Formiat-Dehydrogenase von C. formicoaceticum ist bislang unbekannt (ANDREESEN et al., 1974). Es ist nicht auszuschließen, daß es sich um einen membrangebundenen Elektronenüberträger handelt und das Enzym in vivo locker mit der Membran assoziiert ist. Bei Staphylococcus aureus ist die Formiat-Dehydrogenase-Aktivität in den Membranen nachzuweisen (SALTON, 1967). Wachstums- und Gärversuche mit C. formicoaceticum deuteten auf eine Kopplung von Formiatoxidation und Fumaratreduktion auch in der intakten Zelle hin.

Eine direkte Übertragung von Reduktionsäquivalenten von Pyruvat auf Fumarat, wie sie in Extrakten von Desulfovibrio gigas beobachtet wurde (HATCHIKIAN und LE GALL, 1970b), war bei

C. formicoaceticum nicht nachzuweisen. Möglicherweise verhinderte die durch den Zellaufschluß bedingte Störung der Anordnung aller beteiligten Komponenten eine effektive Elektronenübertragung. Die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase wies in Extrakten nur eine relativ niedrige Aktivität auf (ANDREESEN et al., 1974). Der bei Desulfovibrio gigas an der Fumaratreduktion durch Pyruvat beteiligte Carrier ist nicht bekannt (HATCHIKIAN und LE GALL, 1970b).

Hinweise darauf, daß die Fumarat-Reduktase von C. formicoaceticum zumindest locker mit der Membran verbunden ist, wurden durch die Anwendung verschiedener Aufschlußverfahren gewonnen. Hohe Ionenstärken verminderten die Ablösung des Enzyms von den Partikeln beträchtlich. Die membrangebundene ATPase von Micrococcus lysodeikticus wird bei hohen Ionenkonzentrationen nicht, bei niedrigen jedoch vollständig von der Membran gelöst (MUNOZ et al., 1968; LASTRAS und MUNOZ, 1974). Die ATPase von Escherichia coli ist wahrscheinlich unter Beteiligung von Metallionen mit der Membran verbunden (BRAGG und HOU, 1967). Außerdem scheinen hydrophobe Bindungen eine Rolle zu spielen (MUNOZ et al., 1968). Eine hohe $Mg^{2+}$-Konzentration ist für die Anheftung der ATPase von Streptococcus faecalis an die Membranen erforderlich (ABRAMS und BARON, 1968).

Die spezifische Freisetzung der Fumarat-Reduktase von C. formicoaceticum bei der Sphäroplastenherstellung weist ebenfalls auf eine Beziehung des Enzyms zur Membran hin. Diese selektive Solubilisierung ist charakteristisch für periplasmatische Enzyme gramnegativer Organismen (HEPPEL, 1971; COSTERTON et al., 1974) und bestimmte membrangebundene Proteine grampositiver Bakterien (BIRNBOIM, 1966; MAUCK und GLASER, 1970).

Osmotischer Schock sowie mehrmaliges Waschen ganzer Zellen - Prozeduren, die periplasmatische Enzyme wie z.B. die Hydrogenase von Desulfovibrio gigas (BELL et al., 1974) quantitativ freisetzen - führten entweder zu gar keiner oder nur zur teilweisen Solubilisierung der Fumarat-Reduktase von C. formicoaceticum. Hingegen bewirkte schon Inkubation ganzer Zellen mit Tris und EDTA fast vollständige Abgabe der Fumarat-Reduktase sowie eines großen Teils anderer Proteine ins Medium. Eine Kombination von Tris und EDTA

verändert die Ladung und die Konfiguration der Zelloberfläche von Escherichia coli (GOLDSCHMIDT et al., 1967). EDTA komplexiert zweiwertige Ionen wie $Mg^{2+}$ oder $Ca^{2+}$. Osmotischer Schock in Gegenwart von EDTA begünstigt die Lyse von Escherichia coli (BRAGG und HOU, 1967). Inkubation von Pseudomonas aeruginosa mit Tris und EDTA verhindert irreversibel die Bildung induzierbarer Permeasen bzw. die Funktion der induzierten Enzyme (EAGON und ASBELL, 1966). Weder Tris noch EDTA allein zeigen diesen Effekt.

Ähnlich wie die Fumarat-Reduktase von C. formicoaceticum scheinen auch einige andere Fumarat-Reduktasen nur locker mit der Membran verbunden zu sein. So befindet sich die MV-abhängige $H_2$-Fumarat-Reduktase-Aktivität von Veillonella alcalescens nach Aufschluß mit Alumina überwiegend in der löslichen Fraktion (PECK et al., 1957). Die Fumarat-Reduktase von Streptococcus faecalis wird durch Ultraschallbehandlung weitgehend solubilisiert. Nach partieller Anreicherung dieses Enzyms wurde durch Bio-Gel-Filtration ein Molekulargewicht von etwa 300 000 Dalton bestimmt (AUE und DEIBEL, 1967). Das Enzym scheint demnach wesentlich größer als die aus Hefe isolierten Fumarat-Reduktasen, aber kleiner als dasjenige aus Veillonella alcalescens zu sein (TISDALE et al., 1968; WARRINGA und GIUDITTA, 1958). In den Membranen einer Mutante von Escherichia coli ohne Fumarat-Reduktase-Aktivität fehlt ein Protein vom Molekulargewicht 75 000 Dalton, bei dem es sich vermutlich um eine Komponente der Fumarat-Reduktase handelt (SPENCER und GUEST, 1974).

## 4. Fumarase und Malat-Enzym

Die Fumarase wurde als regulatorisch wichtiges Enzym bei Eukaryonten gut untersucht (HILL und BRADSHAW, 1969). Die Gleichgewichtskonstante der Fumarase-Reaktion beträgt (HILL und BRADSHAW, 1969):

$$K = [\text{L-Malat}] / [\text{Fumarat}] = 4{,}4 \quad (25\ ^{\circ}C)$$

Die Änderung der freien Gibbs-Energie der Reaktion

$$\text{Fumarat} + H_2O \rightleftharpoons \text{L-Malat}$$

ist gering: $\Delta G_o' = -0{,}88$ kcal/mol. Es ist bemerkenswert, daß diese reversible, nicht an einer Verzweigung des Stoffwechsels lokali-

sierte Reaktion Angriffspunkt einer Regulation ist. Das Enzym aus Hefe und anderen höheren Organismen wird durch ATP gehemmt bzw. durch AMP stimuliert (COHEN und PENNER, 1965; ATKINSON, 1966). Demnach wird die Fumarase ähnlich wie die Citrat-Synthase (JANGAARD et al., 1968) durch den energetischen Zustand der Zelle reguliert und so bei ausreichender ATP-Bildung eine unnötig hohe Aktivität des Tricarbonsäurezyklus verhindert. Die Aktivität und die regulatorischen Eigenschaften der Fumarase von Rhodospirillum rubrum sind abhängig von den Anzuchtsbedingungen, besonders der N-Quelle (ANDERSON und FULLER, 1967). Eine substratabhängige Regulation dieses Enzyms könnte auch für den bei C. formicoaceticum beobachteten unterschiedlichen Gärverlauf mit Fumarat und L-Malat verantwortlich sein. Die Fumarase von Bacillus subtilis wird vorwiegend durch Fumarat und nur wenig durch Malat induziert (OHNE, 1975).

Die Fumarase von C. formicoaceticum erwies sich als sehr instabil beim Einfrieren ganzer Zellen und bei Aufbewahrung des Extrakts bei 4 °C. Ähnlich labil ist auch die Fumarase von Desulfovibrio gigas (HATCHIKIAN und LE GALL, 1970a). Das Enzym höherer Organismen besitzt zahlreiche freie SH-Gruppen (KANAREK et al., 1964). Obwohl die Extrakte von C. formicoaceticum stets anaerob aufbewahrt wurden, könnten Spuren von $O_2$ die Oxidation möglicherweise auch für die bakterielle Fumarase wichtiger Thiolgruppen bewirken und so zur Inaktivierung führen. Das Vorkommen der Fumarase in einem Bakterium ist nicht unbedingt mit dem Besitz einer Fumarat-Reduktase gekoppelt. Beispielsweise enthält Streptococcus faecalis, der Fumarat als Elektronenakzeptor verwenden, Malat aber nur oxidativ abbauen kann, keine Fumarase-Aktivität (DEIBEL, 1964).

C. formicoaceticum schleust L-Malat über ein Malat-Enzym in den Intermediärstoffwechsel ein. Die Aktivität einer NAD-abhängigen Malat-Dehydrogenase (YOSHIDA, 1969), die keine $Mg^{2+}$- oder $Mn^{2+}$-Ionen benötigt, konnte nicht nachgewiesen werden. Bislang ist unbekannt, wie C. formicoaceticum Oxalacetat bildet.

Bei aeroben Organismen wie Mycobakterien, Acetobacter xylinum und Micrococcus lysodeikticus wurde eine NAD-unabhängige,

energieliefernde Malat-Vitamin K-Reduktase gefunden (COHN, 1958; BENZIMAN und LEVY, 1966; ANDREJEW et al., 1973). Verschiedene Pseudomonaden enthalten eine partikuläre Malat-Dehydrogenase, die DCPIP reduziert (TIWARI und CAMPBELL, 1969; HOPPER et al., 1970). Eine andere Möglichkeit der Oxalacetat-Bildung aus Malat ist die Kopplung von Malat-Enzym und Pyruvat-Carboxylase. Sofern eine direkte Phosphorylierung von Pyruvat möglich ist, kann Oxalacetat auch aus PEP durch PEP-Carboxylase oder PEP-Carboxykinase entstehen (KORNBERG, 1966). Bei Bacillus subtilis ist die Aktivität der Malat-Dehydrogenase zu niedrig, um den Oxalacetat-Bedarf zu decken; daher erfolgt die Nachlieferung von Oxalacetat durch Malat-Enzym und Pyruvat-Carboxylase (DIESTERHAFT und FREESE, 1973).

Ein Malat-Enzym, das L-Malat unter Decarboxylierung zu Pyruvat oxidiert und $Mn^{2+}$ oder $Mg^{2+}$ benötigt, wurde erstmals aus Taubenleber isoliert (OCHOA et al., 1948; OCHOA, 1955; STICKLAND, 1959a,b). Seitdem wurde das Enzym in zahlreichen höheren Organismen und Bakterien nachgewiesen. Die Malat-Enzyme der Eukaryonten sind mit wenigen Ausnahmen NADP-spezifisch; zum Teil ist eine geringe Aktivität mit NAD vorhanden. Gut charakterisiert wurden die Enzyme aus Rinderherz (FRENKEL, 1971, 1972), Kartoffel (DAVIES und PATIL, 1974), Weizenkeimen (OCHOA, 1955), $C_4$-Pflanzen (Malat-Typ; HATCH und KAGAWA, 1974) sowie Aspergillus nidulans, Neurospora crassa und Fusarium oxysporum (McCULLOUGH und ROBERTS, 1974; ZINK, 1972, 1974; ZINK und KATZ, 1973).

Vorwiegend NAD-spezifische Malat-Enzyme wurden in $C_4$-Pflanzen vom Aspartat-Typ und in Blumenkohl nachgewiesen (HATCH und KAGAWA, 1974; MACRAE, 1971). Aus Kaninchenherz wurde sowohl ein NAD- als auch ein NADP-abhängiges Enzym isoliert (LIN und DAVIES, 1974). Saccharomyces, Ascaris lumbricoides und andere Wirbellose besitzen unspezifische Malat-Enzyme, die NAD und NADP reduzieren (FUCK et al., 1973; SAZ und HUBBARD, 1957; PAPA et al., 1970; PRICHARD und SCHOFIELD, 1968).

Bei Bakterien wurden NAD- und NADP-spezifische Malat-Enzyme beschrieben. Ein NADP-abhängiges Enzym ist z.B. in Chromatium (FULLER und KORNBERG, 1961), Pseudomonas spec. (HIGA et al., 1976;

HOPPER et al., 1970), Mycobacterium (PARVIN et al., 1964), Proteus rettgeri (KRÖGER, 1974), Desulfovibrio gigas (HATCHIKIAN und LE GALL, 1970a), Acinetobacter calcoaceticus (KLEBER, 1975a) und verschiedenen Pansenbakterien (JOYNER und BALDWIN, 1966) enthalten. Bei Bacillus subtilis und Streptococcus faecalis dient NAD als Elektronenakzeptor (DIESTERHAFT und FREESE, 1973; OHNE, 1975; LONDON und MEYER, 1969a,b). Rhodospirillum rubrum scheint sowohl NADP (VERNON und KAMEN, 1953) als auch NAD (FULLER et al., 1961) verwenden zu können.

In Lactobacillus arabinosus, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus casei, Leuconostoc mesenteroides, Streptococcus lactis und anderen Milchsäurebakterien wurde beim Wachstum auf Kohlenhydraten in Gegenwart von Malat ein Malat-Enzym nachgewiesen, das jedoch kein Pyruvat, sondern Lactat bildet (OCHOA, 1955; RADLER et al., 1970; PARK und GUTTMAN, 1973; SCHÜTZ und RADLER, 1973, 1974). Wegen der Bedeutung dieses Enzyms bei der Malo-Lactat-Gärung des Weins wird es auch als Malo-Lactat-Enzym bezeichnet. Die Decarboxylierungsreaktion benötigt NAD und $Mn^{2+}$, $NADH_2$ ist jedoch als Produkt nicht nachweisbar (SCHÜTZ und RADLER, 1974). Von den letztgenannten Organismen kann nur Lactobacillus casei mit L-Malat als C-Quelle wachsen, wobei ein NAD-abhängiges, Pyruvat lieferndes Malat-Enzym induziert wird (LONDON et al., 1970; SCHÜTZ und RADLER, 1974).

Escherichia coli und Pseudomonas aeruginosa enthalten zwei spezifische Malat-Enzyme, von denen eines NAD, das andere NADP reduziert (KATSUKI et al., 1967; MURAI et al., 1972; HANSEN und JUNI, 1974, 1975; EYZAGUIRRE et al., 1973).

Da Malat-Enzym-Aktivität bei C. formicoaceticum sowohl mit NAD als auch mit NADP als Elektronenakzeptor nachgewiesen werden konnte, besteht erstens die Möglichkeit, daß dieser Organismus wie z.B. Saccharomyces (FUCK et al., 1973) nur ein unspezifisches Enzym besitzt. Zweitens könnten jedoch zwei Enzyme mit unterschiedlicher Spezifität und Funktion vorhanden sein. Die Tatsache, daß in eingefrorenen Zellen bzw. in Extrakten nach Aufbewahrung Aktivität mit NAD nicht nachzuweisen war, NADP aber

noch reduziert wurde, könnte als Hinweis auf das Vorkommen zweier Enzyme gewertet werden.

Die bislang beschriebenen Malat-Enzyme können verschiedene Funktionen erfüllen. Die NAD-spezifischen Enzyme, die bei Escherichia coli (MURAI et al., 1972), Lactobacillus casei (LONDON et al., 1970), Streptococcus faecalis (LONDON und MEYER, 1969a), Bacillus subtilis (DIESTERHAFT und FREESE, 1973) sowie in Blumenkohlknospen (MACRAE, 1971) an der Verwertung von $C_4$-Dicarbonsäuren beteiligt sind (katabolische Funktion), dienen der Energielieferung (LONDON und MEYER, 1969a; MACRAE, 1971), der Gluconeogenese (DIESTERHAFT und FREESE, 1973) und der Kontrolle des Dicarbonsäuregehalts der Zelle (MURAI et al., 1972). Hingegen haben die NADP-spezifischen Malat-Enzyme vorwiegend Bedeutung für anabolische Reaktionen, z.B. $NADPH_2$-Lieferung für reduktive Biosynntheseschritte (MURAI et al., 1972; ZINK, 1972; ARONSON et al., 1975) und Pyruvat-Bildung für Aminosäure- und Fettsäuresynthesen sowie Gluconeogenese (CAZZULO und MASSARINI, 1972; MURAI et al., 1972; McCULLOUGH und ROBERTS, 1974; HANSEN und JUNI, 1975).

Pyruvat-Carboxylierung durch das Malat-Enzym scheint bei einigen höheren Organismen eine Rolle zu spielen (WOOD und UTTER, 1965). Das cytoplasmatische Enzym im Rinderherzen dient indirekt der Übertragung von Reduktionsäquivalenten in die Mitochondrien: durch reduktive Carboxylierung von Pyruvat gebildetes Malat kann in die Mitochondrien transportiert und dort wieder oxidativ decarboxyliert werden (FRENKEL , 1972). Die Malat-Bildung nehmen auch OCHOA et al. (1948) als Hauptfunktion des Enzyms in Taubenleber an. Die meisten bislang untersuchten bakteriellen Malat-Enzyme katalysieren unter physiologischen Bedingungen die Malat-Decarboxylierung. Bei Rhodopseudomonas capsulata scheint allerdings die Carboxylierung von Pyruvat durch das Malat-Enzym der $CO_2$-Fixierung im Dunkeln zu dienen (STOPPANI et al., 1955). Das in Micrococcus spec. nachgewiesene Enzym erhält durch die Bildung von Malat die Funktionsfähigkeit des Tricarbonsäure-Zyklus aufrecht (MATULA et al., 1969). Bei Desulfovibrio gigas wird eine physiologische Bedeutung der $CO_2$-Fixierung durch das Malat-Enzym ebenfalls nicht völlig ausgeschlossen (HATCHIKIAN und

LE GALL, 1970a).

Die Malat-Enzyme werden je nach ihrer Funktion unterschiedlich reguliert. Vielfach wird in Gegenwart von Glucose das Malat-Enzym reprimiert oder durch Glykolyse-Intermediärprodukte wie Fructose-1,6-bisphosphat oder 3-Phosphoglycerinsäure gehemmt, so z.B. bei Escherichia coli (MURAI et al., 1972), Streptococcus faecalis (LONDON und MEYER, 1969a,b), Lactobacillus casei (LONDON et al., 1970), Neurospora crassa (ZINK, 1972) und Fusarium oxysporum (ZINK, 1974). Diese Regulation ist verständlich, da bei Verwertung von Kohlenhydraten Pyruvat in ausreichender Menge gebildet wird und im allgemeinen auch die Energieversorgung gesichert ist. Andererseits induzieren oder aktivieren Fumarat, Malat, Succinat oder Aspartat die Malat-Enzyme von Escherichia coli (MURAI et al., 1972; TAKEO et al., 1967; YAMAGUCHI et al., 1974), Bacillus subtilis (OHNE, 1975), Pseudomonas putida (JACOBSEN et al., 1966), Aspergillus nidulans (McCULLOUGH und ROBERTS, 1974), Fusarium oxysporum (ZINK, 1974), Kartoffel (DAVIES und PATIL, 1974) und Rinderherz (FRENKEL, 1972). Das Malat-Enzym von Desulfovibrio gigas wird konstitutiv gebildet (HATCHIKIAN und LE GALL, 1970a).

Malat-Enzyme mit biosynthetischer Funktion unterliegen häufig einer Hemmung durch Oxalacetat oder Aspartat (KATSUKI et al., 1967; SANWAL und SMANDO, 1969; ZINK, 1972; DAVIES und PATIL, 1974). Dient das Malat-Enzym der Energiegewinnung, wird es meist durch ATP, eine hohe "energy charge" (ATKINSON, 1972; CHAPMAN et al., 1971) oder ein hohes $NADH_2$/NAD-Verhältnis gehemmt (LONDON und MEYER, 1969b; SANWAL, 1970; MACRAE, 1971; DAVIES und PATIL, 1974; OHNE, 1975; KLEBER, 1975b).

Die Funktion des Malat-Enzyms von C. formicoaceticum besteht vermutlich überwiegend im Malat-Abbau. Beim Wachstum auf Fructose war nur eine geringe Aktivität nachzuweisen. Die Fähigkeit des Enzyms, NAD und NADP zu reduzieren, dürfte vorteilhaft für die Zelle sein, da sowohl $NADPH_2$ für Biosynthesen als auch $NADH_2$ für möglicherweise energieliefernde Reaktionen, wie z.B. Fumaratreduktion, zur Verfügung stehen, ohne daß eine energieaufwendige

Transhydrogenierung erforderlich ist. Eine Regulation des Malat-Enzyms von C. formicoaceticum durch den energetischen Zustand der Zelle erschiene sinnvoll, da der $C_4$-Dicarbonsäureabbau primär der Energiegewinnung dient. Die genaue Bestimmung der regulatorisch wirksamen Faktoren setzt allerdings die Isolierung des Enzyms voraus.

## 5. Cytochrom und Menachinon in C. formicoaceticum und C. thermoaceticum

In Zellen von C. formicoaceticum und C. thermoaceticum konnten Cytochrom b und Menachinon nachgewiesen werden (GOTTWALD et al., 1975). Die Bildung hämhaltiger Proteine durch andere Clostridien wurde bislang nicht beschrieben. Lediglich D'EUSTACHIO (1966) berichtete von einem möglicherweise Häm enthaltenden Protein in C. pasteurianum.

Das in C. formicoaceticum nachgewiesene Cytochrom b unterscheidet sich von anderen protohämhaltigen Cytochromen durch die ungewöhnliche Lage der Banden in Differenzspektren. Das α-Maximum von Cytochromen des b-Typs liegt im allgemeinen zwischen 556 und 563 nm (LEMBERG und BARRETT, 1973). Ein Gipfel nahe bei 550 nm weist normalerweise auf ein Cytochrom c hin (BARTSCH, 1968). In Membranen von Micrococcus lysodeikticus wurde ein Cytochrom b-562 gefunden, dessen α-Bande sich nach der Solubilisierung allmählich zu 552 bis 554 nm hin verschob (LEMBERG und BARRETT, 1973). Eine Reaktion von Vinyl-Resten des Protohäm mit dem Protein (keine Thioätherbindung) könnte eine Verschiebung des α-Peaks von Cytochrom b zu kürzeren Wellenlängen bewirken (MORTON und SHEPLEY, 1965). Da elektronenanziehende Seitenketten die Absorptionsmaxima zum längerwelligen Spektralbereich hin verschieben (FALK, 1964; LEMBERG und BARRETT, 1973), dürfte andererseits eine Verlagerung zu kürzeren Wellenlängen eintreten, wenn einzelne Substituenten, z.B. gesättigte aliphatische Reste, Elektronen in den Porphyrinring hineinschieben. Strukturelle Besonderheiten des Cytochroms von C. formicoaceticum könnten ebenfalls für die variable Lage (418 - 426 nm) bzw. die Spaltung der Soret-Bande (419 - 420 nm

und 426 nm) verantwortlich sein. Bakterielle Cytochrome c besitzen in diesem Bereich im allgemeinen ein Maximum zwischen 416 und 418 nm, während die Bande von Cytochrom b um 426 nm liegt (BARTSCH, 1968; LEMBERG und BARRETT, 1973). Gespaltene Soret-Peaks wurden z.B. bei Cytochrom c' und cc' aus Rhodospirillaceen gefunden (DE KLERK et al., 1965). DUS et al. (1968) und IMAI et al. (1969) nehmen an, daß eine stark asymmetrische Protein-Umgebung bzw. ungewöhnliche hydrophobe Strukturen in der Nachbarschaft des Häms für die spektralen Besonderheiten verantwortlich sind. Die Doppelbanden wandeln sich bei pH-Werten oberhalb 12,5 in einfache Gipfel um (IMAI et al., 1969). Auch bei C. formicoaceticum wiesen Proben, die bei pH 7,0 ein gespaltenes Soret-Maximum ergaben, bei pH 12,0 nur noch einen Peak bei 418 nm auf. Genauere Aussagen über pH-abhängige Veränderungen im Molekül setzen die Isolierung des Cytochroms aus C. formicoaceticum voraus. Auch die Anwesenheit mehrerer Cytochrome bzw. verschiedener Hämgruppen in einem Molekül könnte das Auftreten gespaltener Banden erklären. Dann wären allerdings im allgemeinen eher Doppelgipfel beim α- und β-Maximum als bei der Soret-Bande zu erwarten (NEWTON, 1969; LEMBERG und BARRETT, 1973).

Bei einem halotoleranten, denitrifizierenden Micrococcus wurde ein "Cytochrom B-574" nachgewiesen, das in ganzen Zellen und in Extrakten reversibel in ein Cytochrom c-552,548 umgewandelt werden kann (LEMBERG und BARRETT, 1973). In der "B"-Form scheinen alle Vinylgruppen gesättigt zu sein, da die Soret-Bande bei 418 nm liegt. Bei einer Übergangsform war jedoch nur eine Vinylgruppe verändert.

Möglicherweise handelt es sich bei dem Cytochrom in C. formicoaceticum um ein Pigment, das ungewöhnliche Substituenten am Porphyringerüst besitzt oder in dem das Häm atypisch mit dem Protein verbunden ist. Es ist bemerkenswert, daß das Cytochrom mit CO reagierte. CO-bindende Pigmente wurden schon bei anderen obligat anaeroben Organismen beschrieben, z.B. bei Bacteroides spec. (WHITE et al., 1962; RIZZA et al., 1968), Desulfovibrio desulfuricans (JONES, 1971), Selenomonas ruminantium, Veillonella alcalescens, Anaerovibrio lipolytica (DE VRIES et al., 1974)

und bei Eubacterium lentum (SPERRY und WILKINS, 1976). Die Funktion dieser Pigmente bei Anaerobiern ist bislang unbekannt. Da CO-Reaktivität im allgemeinen auf eine Wirkungsweise des Cytochroms als Oxidase hinweist (BARTSCH, 1968; LEMBERG und BARRETT, 1973), wäre eine Bedeutung dieser Cytochrome als $O_2$-Schutz vorstellbar (POSTGATE, 1956). Allerdings scheint die relativ unspezifische Reaktionsfähigkeit mancher Cytochrome b mit CO bzw. $O_2$ nicht unbedingt eine in vivo-Funktion als Oxidase anzuzeigen (LEMBERG und BARRETT, 1973).

Das Cytochrom von C. thermoaceticum besitzt ein für Cytochrom b charakteristisches Spektrum, wurde jedoch bisher noch nicht näher untersucht (GOTTWALD et al., 1975).

Eine Einordnung der in C. formicoaceticum und C. thermoaceticum vorkommenden Chinone ist auf Grund der vorliegenden Daten noch nicht möglich. Aus Desulfovibrio wurde ein für Bakterien ungewöhnliches MK-6 isoliert (WEBER et al., 1970; MAROC et al., 1970), dessen Beteiligung an der $H_2$-Fumarat-Reduktase bestätigt werden konnte (HATCHIKIAN, 1974). Streptococcus faecalis enthält 3-Solanesyl-1,4-Naphthochinon (BAUM und DOLIN, 1965). Es ist bemerkenswert, daß dieses Chinon nicht wie andere Menachinone in 2-Stellung substituiert ist. Propionibakterien enthalten Menachinone mit teilweise reduzierter Seitenkette, MK-9(4H) (SCHWARTZ, 1973; SONE, 1974a).

In C. formicoaceticum wurde das Cytochrom b nach Anzucht auf Komplexmedien mit Fumarat oder L-Malat in höherer Konzentration synthetisiert als in Gegenwart von Fructose. Das wies zunächst auf einen Zusammenhang mit der Fumarat-Reduktase hin. Da das Pigment jedoch auch beim Wachstum mit Substraten, aus denen kein Succinat gebildet wurde, in deutlich meßbaren Mengen vorhanden war, erscheint eine ausschließliche, spezifische Kopplung mit der Fumaratreduktion fraglich. Die Funktion des Cytochroms in C. thermoaceticum, das weder Fumarat noch L-Malat umsetzen kann (ANDREESEN et al., 1973), ist ebenfalls unbekannt.

Der Cytochromgehalt in C. formicoaceticum stieg mit zunehmendem

Alter der Zellen an. Die vermehrte Bildung von Cytochromen während der stationären Phase wurde bei verschiedenen Bakterien beobachtet (SMITH, 1954a,b; SPICHER, 1974). Bei Bacillus cereus steigt der Cytochromgehalt während der Sporulation (WEBER und BROADBENT, 1975). Die Konzentration der Cytochrome in Bakterienzellen wird durch Faktoren wie pH-Wert, Redoxpotential, Fe-Gehalt und Alter der Kultur kontrolliert (JURTSHUK et al., 1975). Nach Ansicht von LASCELLES (1968) könnte die Anhäufung von Hämoproteinen nach Beendigung des Wachstums auf einer Fehlregulation infolge von Nährstoffmangel beruhen.

In C. formicoaceticum und C. thermoaceticum könnte sowohl das Cytochrom b als auch das Menachinon mit einem noch unbekannten Elektronentransport-System verbunden sein. Da C. formicoaceticum offenbar die Fähigkeit besitzt, Schwefel zu Sulfid zu reduzieren (ANDREESEN, persönliche Mitteilung), wäre auch eine Beteiligung der Elektronentransport-Komponenten an dieser Reduktion vorstellbar. Formiat stimulierte die Cytochromsynthese in C. formicoaceticum. Desulfovibrio gigas besitzt eine Formiat-Cytochrom c -Oxidoreduktase (YAGI, 1969). Die bei Escherichia coli an der Nitratreduktion durch Formiat beteiligte Formiat-Dehydrogenase überträgt die Elektronen auf ein Cytochrom b (RUIZ-HERRERA und ALVAREZ, 1972; ENOCH und LESTER, 1974). Eine Funktion des Cytochroms in C. formicoaceticum als Elektronenakzeptor der Formiat-Dehydrogenase ist ebenfalls nicht auszuschließen.

Ein Menachinon könnte bei beiden Homoacetatgärern bei anabolischen Reaktionen eine Rolle spielen. Escherichia coli benötigt für die anaerobe Pyrimidinsynthese und die oxidativen Schritte der Hämsynthese Fumarat als Elektronenakzeptor (NEWTON et al., 1971; COX und GIBSON, 1974; JACOBS und JACOBS, 1975). Menachinon ist ein notwendiger Cofaktor der Dihydroorotat-Dehydrogenase (NEWTON et al., 1971). Bei Bacillus subtilis ist Menachinon für die Glycosylierung von Membranproteinen in der frühen Sporulationsphase unerläßlich (FARRAND und TABER, 1973).

## IV. ZUSAMMENFASSUNG

1. Fumarat und L-Malat wurden von C. formicoaceticum sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von Bicarbonat oder Formiat verwertet. Bei Einsatz von jeweils 100 mM Substrat wurden etwa 120 mM Bicarbonat als günstigste Konzentrationen ermittelt. Die kürzeste Verdopplungszeit betrug beim Wachstum auf 100 mM Fumarat 2,9 Stunden (in Abwesenheit von Bicarbonat). Bei Verwertung von 100 mM L-Malat wuchs der Organismus langsamer: die höchste Wachstumsrate $\mu$ = 0,1 Std.$^{-1}$ entsprechend $t_d$ = 6,9 Std. wurde in Gegenwart von 120 mM Formiat beobachtet. Mit beiden Substraten wurden optische Dichten (600 nm) zwischen 1,5 und 2,0 erreicht.

2. Vollständige Versporung fand nur beim Wachstum auf Fumarat in Gegenwart hoher Bicarbonatkonzentrationen statt.

3. Beim Wachstum auf Fumarat und L-Malat wurden als Gärprodukte Acetat, Succinat und $CO_2$ gebildet. Diente Fumarat als Substrat, erfolgte eine Disproportionierung zu Acetat, $CO_2$ und Succinat nach dem Schema 3 Fumarat + 2 $H_2O$ ⟶ 2 Succinat + 1 Acetat + 2 $CO_2$ . L-Malat wurde hingegen fast vollständig zu Acetat und $CO_2$ vergoren. Der Zusatz von Bicarbonat bewirkte im allgemeinen keine wesentliche Veränderung der Gärbilanzen. Gelegentlich wurde beim Wachstum auf Fumarat in Gegenwart von Bicarbonat zwischenzeitlich bis zu 20 mM L-Malat im Medium angehäuft. In Anwesenheit von Formiat wurde mehr Fumarat in Succinat umgewandelt als in Abwesenheit des Elektronendonators. Beim Wachstum auf L-Malat wurde Formiat jedoch lediglich zu Acetat und $CO_2$ disproportioniert.

4. Die molaren Ertragskoeffizienten $Y_m$ betrugen bei Verwertung von Fumarat etwa 5 - 6 g Trockengewicht/mol Substrat, beim Wachstum auf L-Malat wurden Werte zwischen 7 und 8 g Trockengewicht/mol erreicht.

5. Bei gleichzeitigem Angebot von 100 mM Fumarat und 22 mM Fructose verwertete C. formicoaceticum beide Substrate nur in

Gegenwart von Bicarbonat. In Abwesenheit von Bicarbonat wurde lediglich Fumarat vergoren.

6. Fumarat und L-Malat wurden durch ruhende Zellen schnell umgesetzt. Die Vergärung von Fumarat erfolgte nach dem unter Wachstumsbedingungen gültigen Schema. Ein Gärversuch mit 1,4-$^{14}$C-Fumarat zeigte, daß $CO_2$-Reduktion zu Acetat bei der Verwertung von Fumarat keine Rolle spielte. Malatvergärung durch ruhende Zellen führte zu einer höheren Succinatproduktion als beim Wachstum. Es galt mindestens: 6 Malat ⟶ 1 Succinat + 7,25 Acetat + 5,5 $CO_2$ + 0,5 $H_2O$. In Gegenwart von Formiat konnte aus Malat fast so viel Succinat wie bei der Vergärung von Fumarat gebildet werden. Die C- und O/R-Bilanzen waren bei der Umsetzung beider Dicarbonsäuren ausgeglichen. Aus den Gärbilanzen konnten allgemeine Gärgleichungen hergeleitet werden.

7. Auf Fructose gewachsene Zellen konnten auch Fumarat vergären. Mehr als die Hälfte des Substrats wurde allerdings lediglich zu Malat umgewandelt, das nur sehr langsam weiter abgebaut wurde. Die Umsetzung von Fumarat erfolgte am schnellsten in Gegenwart von Formiat. Die Produkte Succinat, Acetat und $CO_2$ wurden etwa im gleichen Mengenverhältnis gebildet wie bei Vergärung von Fumarat durch Zellen, die auf dieser Dicarbonsäure angezogen worden waren.

8. In Rohextrakten von C. formicoaceticum nach Anzucht auf Fumarat und L-Malat konnte eine hohe Fumarat-Reduktase-Aktivität nachgewiesen werden. Als Elektronendonatoren wurden im manometrischen Test reduziertes MV und $FMNH_2$ verwendet. Partikelpräparationen junger Zellen nach Anzucht auf Fumarat zeigten auch eine niedrige $NADH_2$-Fumarat-Reduktase-Aktivität. Die spezifischen Aktivitäten betrugen mit MV 3,5 E/mg, mit FMN 0,16 E/mg und mit $NADH_2$ 0,02 - 0,03 E/mg Protein. Die Aktivität mit $NADH_2$ ging sehr schnell verloren, die mit MV gemessene war dagegen auch bei längerer Aufbewahrung bei -20 °C relativ stabil. Nicht aufgetrennte Extrakte reduzierten Fumarat auch in Gegenwart von Formiat. Die Reaktion wurde durch MV beschleunigt. Fumarat-Reduktase-Aktivität mit reduziertem MV war auch in Extrakten von Zellen nach Anzucht auf Fructose und anderen Substraten

vorhanden. Die spezifische Aktivität betrug jedoch maximal 0,7 E/mg Protein. Succinat-Dehydrogenierung konnte nicht nachgewiesen werden.

9. Bei Extraktherstellung durch Lysozymaufschluß in einem Puffer hoher Ionenstärke blieb die Fumarat-Reduktase-Aktivität überwiegend mit den Partikeln verbunden. Die Herstellung von Sphäroplasten in 20 mM HEPES-Puffer mit 0,6 M Saccharose führte zur Freisetzung von über 80% der Fumarat-Reduktase-Aktivität in den Sphäroplastenüberstand. Hingegen befanden sich Malat-Enzym- und Acetat-Kinase-Aktivität zu 80 - 90% in der löslichen Extraktfraktion nach der Lyse der Sphäroplasten. Diese Befunde deuteten auf eine zumindest lockere Bindung der Fumarat-Reduktase an die Membranen hin.

10. Die Aktivitäten von Fumarase, Malat-Enzym, Acetat-Kinase und Formiat-Dehydrogenase waren in Zellen nach Anzucht auf den $C_4$-Dicarbonsäuren vorhanden. Die Fumarase-Aktivität war nur in Extrakten frisch geernteter Zellen nachweisbar (0,2 E/mg Protein). Das Malat-Enzym benötigte $Mn^{2+}$ oder $Mg^{2+}$ und reduzierte sowohl NAD als auch NADP. Die höchste Aktivität wurde in Lysozymextrakten von Zellen nach Anzucht auf L-Malat nachgewiesen (1,0 E/mg). French-Press-Aufschluß, Aufbewahrung der Zellen bei -20 $^{o}$C und Lagerung der Extrakte bei +4 $^{o}$C führten zu einem weitgehenden Verlust der Aktivität. Die Acetat-Kinase-Aktivität war dagegen relativ stabil. Die spezifische Aktivität lag je nach Substrat und sonstigen Anzuchtsbedingungen zwischen 2,1 und 10,5 E/mg Protein. Die Formiat-Dehydrogenase wies in Extrakten nach Anzucht auf Fumarat und L-Malat mit MV als Elektronenakzeptor eine Aktivität von 0,6 - 1,2 E/mg Protein auf.

11. Versuche mit nicht aufgetrennten Rohextrakten von C. formicoaceticum lieferten Hinweise auf das Vorkommen einer ATPase-Aktivität, die $Mg^{2+}$ oder $Ca^{2+}$ benötigte und durch DNP stimuliert wurde. In der löslichen Extraktfraktion konnte allerdings auch eine niedrige p-Nitrophenylphosphatase-Aktivität nachgewiesen werden.

12. In C. formicoaceticum wie auch in C. thermoaceticum wurden Cytochrome vom b-Typ gefunden. Mit Partikelsuspensionen von C. formicoaceticum aufgenommene Redox-Differenzspektren lieferten Banden bei 552, 522 - 525 und 424 - 426 nm bzw. einen Doppelgipfel bei 419 - 420 nm und 426 nm. Dieses und andere Spektren (Tieftemperatur- und Pyridin-Hämochrom-Differenzspektren) wiesen zwar auf ein Cytochrom c hin, jedoch konnte die Hämgruppe durch Aceton-HCl-Gemische extrahiert und als Protohäm identifiziert werden. Das Pigment reagierte mit CO. Der Cytochromgehalt war am höchsten in Zellen nach Anzucht auf Fumarat oder L-Malat. Allerdings wurden auch nach Anzucht auf Fructose und anderen Substraten geringe, aber deutlich meßbare Mengen des Cytochroms gebildet. Die Pigmentkonzentration stieg mit zunehmendem Alter der Zellen. Nach Anzucht auf Fumarat, L-Malat oder Fructose betrug der Cytochromgehalt der Partikel maximal 0,13 , 0,17 bzw. 0,06 µmole/g Protein (Berechnung aus $\Delta E_{(552 - 566\ nm)}$ mit ε(Cytochrom b) = 20 $mM^{-1}$ $cm^{-1}$; CHANCE und WILLIAMS, 1956). Das Cytochrom b von C. thermoaceticum lieferte ein für protohämhaltige Cytochrome charakteristisches Spektrum mit Banden bei 556, 522 und 422 nm.

13. In Extrakten von C. formicoaceticum und C. thermoaceticum wurde Menachinon gefunden. Die Konzentration war allerdings in beiden Organismen sehr gering (C. formicoaceticum: 0,03 µmole pro g Protein, C. thermoaceticum: 0,32 µmole pro g Protein).

# V. MATERIAL UND METHODEN

## 1. Organismen

Die vorliegenden Untersuchungen wurden im wesentlichen mit Clostridium formicoaceticum Stamm A1 (ANDREESEN et al., 1970; ATCC 27076; DSM 92) durchgeführt. Zu Vergleichszwecken wurden außerdem C. formicoaceticum Stamm El Ghazzawi (EL GHAZZAWI, 1967; ATCC 23439; DSM 93) und Clostridium thermoaceticum (FONTAINE et al., 1942; DSM 521) hinzugezogen.

Hydrogenasehaltige Rohextrakte für manometrische Messungen wurden aus Clostridium pasteurianum (ATCC 6013) hergestellt.

## 2. Nährlösungen und Anzuchtsbedingungen für C. formicoaceticum

| | | |
|---|---|---|
| A) | Hefeextrakt (Difco) | 5 g |
| | $H_2O$ bidest. | ad 300 ml |
| B) | Na-Thioglykolat (Difco) | 750 mg |
| | $H_2O$ bidest. | ad 10 ml |
| C) | Fumarsäure | 11,6 g |
| | bzw. L-Äpfelsäure | 13,4 g |
| | NaOH | 8,0 g |
| | $H_2O$ bidest. | ad 500 ml |
| | pH 8,0 | |
| D) | $K_2HPO_4$ | 10 g |
| | $NaHCO_3$ | 10 g |
| | (bzw. Na-Formiat | 8 g) |
| | $H_2O$ bidest. | ad 200 ml |
| | pH 8,0 - 9,0 | |
| E) | Pyridoxin-Lösung (50 mg/100 ml) | 2 ml |
| F) | Spurenelement-Lösung SL 4 (PFENNIG und LIPPERT, 1966) ohne Fe, Mo und EDTA; 10-fach konz. | 1 ml |

G) $Fe(II)(NH_4)_2(SO_4)_2 \times 6\ H_2O$ ($10^{-1}$ M)
Tri-Na-Citrat ($10^{-1}$ M) 1 ml

H) $Na_2SeO_3 \times 5\ H_2O$ ($10^{-3}$ M) 1 ml

I) $Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$ ($10^{-2}$ M) 1 ml

Die Lösungen A, B, C, E, F, H und I wurden 20 Minuten bei 120 °C autoklaviert; D und G wurden sterilfiltriert. Von E, F, G, H und I wurden 1 bzw. 2 ml der konzentrierten sterilen Lösung dem Nährmedium (1 l) kurz vor dem Beimpfen zugesetzt.

Die Nährlösungen für die Anzucht auf D-Fructose, Glycerin, DL-Lactat und L-Glutamat enthielten in Lösung C:

| | |
|---|---|
| D-Fructose | 4 g |
| bzw. Glycerin | 10 g |
| bzw. Na-DL-Lactat | 11,2 g |
| bzw. L-Glutamat | 10 g |
| $H_2O$ bidest. ad | 500 ml |

Die Lösungen wurden 20 Minuten bei 120 °C autoklaviert. Agar-Medien für Verdünnungsreihen enthielten neben 10 g Fructose 15 g Bacto-Agar (Difco)/1 l. Flüssigkeitskulturen von C. formicoaceticum wurden in Reagenzgläsern bzw. 30 ml-Teströhrchen (Fa. Bausch & Lomb, Rochester, New York), 100 ml-Schraubverschlußflaschen, 1 l-Meßkolben oder 3-, 5- bzw. 10 l-Steilbrustflaschen bei 37 °C inkubiert. Die 3 l-Flaschen besaßen einen Auslauf zur Probenentnahme. Kulturen in Reagenzgläsern wurden mit Hilfe von Wright-Burri-Verschlüssen (festes Pyrogallol + 20%-ige $K_2CO_3$-Lösung) anaerob verschlossen. Schraubdeckelflaschen wurden vollständig gefüllt. Meßkolben wurden lediglich mit einem sterilen Watte- und einem Gummistopfen verschlossen. Bei Steilbrustflaschen genügte ebenfalls ein Gummistopfen als Verschluß. Größeren Kulturvolumina (5, 10 l) wurden kurz vor dem Beimpfen 35 mg Na-Dithionit/l anstelle von Na-Thioglykolat als Reduktionsmittel zugesetzt.

Flüssigkeitskulturen wurden mit gut wachsenden Vorkulturen im Verhältnis 1 : 50 bis 1 : 20 beimpft.

Die Zellen wurden nach der in den Experimenten angegebenen Wachstumsdauer (14 - 30 Std.; $OD_{600}$ = 0,6 - 1,8) mit einer Sorvall Superspeed RC2-B-Zentrifuge (Fa. Ivan Sorvall Inc., Newtown, Connecticut) bei 10 000 x g (30 Minuten) geerntet. Sie wurden entweder sofort weiter verwendet oder in Plastikflaschen bei -20 °C aufbewahrt. Die Ausbeuten betrugen bei Anzucht auf Fumarat und L-Malat 1,5 - 3,2 g Naßgewicht pro Liter.

Agarhaltige Nährlösungen für Verdünnungsreihen wurden nach dem Autoklavieren im Wasserbad auf 45 - 50 °C abgekühlt, mit den übrigen Bestandteilen vereinigt und in 9 ml-Aliquots auf sterile Reagenzgläser verteilt. Ein Röhrchen wurde mit 1 ml einer Flüssigkeitskultur beimpft. Nach dem Mischen wurde 1 ml dieses Ansatzes ins nächste Reagenzglas übertragen. Auf diese Weise wurden Verdünnungen von 1 : $10^4$ bis 1 : $10^5$ hergestellt. Die Röhrchen wurden mit Wright-Burri-Verschlüssen anaerob gehalten und bei 37 °C 1 - 2 Tage inkubiert. Zum Abimpfen von Einzelkolonien wurde der Agarblock unter Druck mit Hilfe einer sterilen, gestopften Pasteurpipette in eine sterile Petrischale überführt. Einzelkolonien wurden mit Pasteurpipetten angesaugt, in 0,5 ml sterilem Phosphatpuffer suspendiert und 10 Minuten bei 75 - 80 °C pasteurisiert. Die so erhaltenen Sporensuspensionen dienten zum Beimpfen von Flüssigkeitskulturen (10 ml) bzw. weiteren Verdünnungsreihen in Hochschicht-Agar.

Zellen aus Schrägagar-Stammkulturen wurden ebenfalls vor dem Überimpfen in flüssige Nährlösungen pasteurisiert.

3. Nährlösung für die Anzucht von C. thermoaceticum

| | | |
|---|---|---|
| A) | Hefeextrakt (Difco) | 5 g |
| | Trypton (Difco) | 5 g |
| | $(NH_4)_2SO_4$ | 1 g |
| | $MgSO_4$ x 7 $H_2O$ | 0,25 g |
| | Na-Thioglykolat (Difco) | 0,5 g |
| | $Co(NO_3)_2$ x 6 $H_2O$ | 29 mg |
| | $CaCl_2$ x 2 $H_2O$ | 20 mg |

| | | |
|---|---|---|
| | $MnCl_2 \times 4\ H_2O$ | 5 mg |
| | $H_2O$ bidest. | ad 500 ml |
| B) | D-Fructose | 18 g |
| | $H_2O$ bidest. | ad 150 ml |
| C) | $K_2HPO_4$ | 7,0 g |
| | $KH_2PO_4$ | 5,5 g |
| | $NaHCO_3$ | 2 g |
| | $H_2O$ bidest. | ad 250 ml |
| | pH 7,2 - 7,5 | |
| D) | $Fe(II)(NH_4)_2(SO_4)_2 \times 6\ H_2O$ ($10^{-1}$ M) | |
| | Tri-Na-Citrat ($10^{-1}$ M) | 1 ml |
| E) | $Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$ ($10^{-2}$ M) | 1 ml |
| F) | $Na_2SeO_3 \times 5\ H_2O$ ($10^{-3}$ M) | 1 ml |

Die Lösungen A, E und F wurden 20 Minuten bei 120 °C autoklaviert, B, C und D wurden sterilfiltriert. Von D, E und F wurde je 1 ml einer konzentrierten sterilen Lösung dem Nährmedium (1 l) vor dem Beimpfen zugesetzt. Nach der Vereinigung aller Nährlösungsbestandteile wurde mit einer gut gewachsenen Vorkultur im Verhältnis 1 : 10 beimpft. Inkubation erfolgte in 1 l-Erlenmeyerkolben bei 56 °C unter $CO_2$-Begasung.

4. Nährlösung für die Anzucht von C. pasteurianum
(vereinfacht nach von HUGO, 1973)

| | |
|---|---|
| Glucose | 2 g |
| Pepton | 0,2 g |
| Trypton | 0,2 g |
| Hefeextrakt | 0,6 g |
| $MgSO_4$ (0,2 M) | 0,05 ml |
| $CaCl_2$ (1 M) | 0,01 ml |
| Na-Thioglykolat | 50 mg |
| $K_2HPO_4$ (1 M) | 3,24 ml |
| $KH_2PO_4$ (1 M) | 0,76 ml |
| $H_2O$ bidest. | ad 100 ml |
| pH 7,4 | |

Phosphatpuffer und übrige Nährlösungsbestandteile wurden getrennt 20 Minuten bei 120 °C autoklaviert. 10 l-Kulturen in Steilbrustflaschen wurden jeweils mit 1 l einer gut gewachsenen Vorkultur beimpft und bei 37 °C inkubiert. Wegen starker $H_2$-Entwicklung wurden die Flaschen nur mit Wattestopfen verschlossen. 10 l-Ansätze erhielten anstelle von Na-Thioglykolat kurz vor dem Beimpfen 35 mg Na-Dithionit/l.

Die Zellen wurden mit einer WKF-Zentrifuge (WKF-Forschungsgeräte GmbH, Brandau/Darmstadt) bei 14 000 x g (0 °C) geerntet und bei -20 °C aufbewahrt. Die Ausbeuten betrugen 3,6 - 4,7 g Zellnaßgewicht pro Liter.

5. Wachstumsversuche mit C. formicoaceticum

Die Versuche zur Optimierung der Substratkonzentrationen (Fumarat, L-Malat, Bicarbonat, Formiat) und des pH-Wertes wurden in 30 ml-Teströhrchen (Fa. Bausch & Lomb) durchgeführt.

Die Kulturen zur Bestimmung aller Wachstumsparameter unter optimalen Anzuchtsbedingungen wurden in 1 l-Meßkolben im Wasserbad bei 37 °C unter $O_2$-freiem Stickstoff angezogen (GOTTWALD, 1973). Die Kolben wurden mit Gummistopfen verschlossen. Probenentnahme erfolgte im allgemeinen alle 2 - 4 Stunden unter $N_2$-Druck mittels zweier Kanülen, von denen eine in die Kulturflüssigkeit eintauchte und mit einem Probennehmer verbunden war, während die andere zum Begasen diente. Trübung und pH-Wert der Proben wurden sofort gemessen; dann wurden die Zellen zur Trockengewichts- und Proteinbestimmung abzentrifugiert. Die Überstände wurden bei -20 °C in Plastikflaschen aufbewahrt.

Zur Entfernung von Sauerstoff aus dem verwendeten Stickstoff (Zwei-Ring-Qualität) wurde das Gas über einen auf 200 °C erhitzten Katalysator (Aktimet 13; Fa. Doduco Chemie, Pforzheim) und anschließend zur Befeuchtung durch eine mit Wasser gefüllte Waschflasche geleitet. Zur Aktivierung bzw. Regeneration wurde der Katalysator zunächst mit $N_2$ zur Entfernung von $O_2$-Spuren und

dann mit $H_2$ durchströmt, bis die grünliche Färbung der oxidierten Substanz in ein dunkles Violett umgeschlagen war (SCHOBERTH, 1970).

5.1. Trübungsmessungen

Die optische Dichte von Reagenzglaskulturen wurde direkt in den 30 ml-Teströhrchen im Spectronic 20-Photometer (Fa. Bausch und Lomb, Rochester, New York) bei 600 nm gegen unbeimptte Nährlösung gemessen. In den Proben aus größeren Kulturen wurde die Trübung im Zeiss PM 4-Spektralphotometer bei 600 nm (d = 1 cm) gegen Wasser als Leerwert gemessen. Bei Dichten höher als 0,3 wurde entsprechend verdünnt.

5.2. Proteinbestimmung an ganzen Zellen (STICKLAND, 1951)

Reagens A: 20% NaOH (Gewicht/Volumen-%)
Reagens B: 25% $CuSO_4 \times 5\ H_2O$

20 - 50 ml Zellsuspension wurden abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 2 - 4 ml $H_2O$ bidest. resuspendiert. 2 ml dieser Suspension wurden mit 4,6 ml $H_2O$ bidest. und 1,2 ml Reagens A versetzt, 20 Minuten im Wasserbad gekocht und im Eisbad abgekühlt. Nach Zugabe von 0,2 ml Reagens B wurde der sich bildende Niederschlag sofort mit einem Glasstab zerstoßen. Anschließend wurde 15 Minuten bei 3500 Upm zentrifugiert (Christ Junior II-Zentrifuge, Fa. Heraeus-Christ, Osterode/Harz). Die Extinktion des Überstandes wurde im Zeiss PM 4-Photometer (d = 1 cm) bei 546 nm gegen einen Leerwert gemessen. Eichkurven wurden mit Rinderserumalbumin zwischen 0,5 und 25 mg Protein pro ml Probe aufgenommen.

5.3. Trockengewichtsbestimmung

50 ml Probe oder je nach Zelldichte auch weniger wurden bei 13 000 x g und 4 °C abzentrifugiert (Sorvall RC2-B-Zentrifuge). Die Zellen wurden in 2 - 4 ml $H_2O$ bidest. aufgenommen und in vorher gewogene, staubfreie Zentrifugenröhrchen überführt. Die Proben wurden 24 - 48 Stunden bei 80 °C getrocknet und nach Abküh-

lung im Exsikkator erneut gewogen. Aus der Gewichtsdifferenz ließ sich das Trockengewicht der Zellen (mg/ml) berechnen.

5.4. Bestimmung der Wachstumsrate und der Verdopplungszeit

Aus der Trockengewichtszunahme wurden nach folgenden Formeln Wachstumsrate $\mu$ und Verdopplungszeit $t_d$ berechnet:

$$\mu = \frac{\log x_t - \log x_o}{\log e \cdot (t - t_o)} \qquad t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

$x_t$ = TG zum Zeitpunkt t  log e = 0,434

$x_o$ = TG zum Zeitpunkt $t_o$  ln 2 = 0,693

5.5. Bestimmung von Fumarat und L-Malat (nach KRÖGER, 1974)

| | | Konz. im Test |
|---|---|---|
| 0,445 ml | 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,5 | 89 mM |
| 0,020 ml | verdünnte Probe (bis 1,5 mM Fumarat oder L-Malat) | bis 0,06 mM |
| 0,005 ml | Citrat-Synthase (1 mg/ml) | |
| 0,005 ml | Phosphotransacetylase (0,1 mg/ml) | |
| 0,005 ml | 25 mM APAD | 0,25 mM |
| 0,005 ml | 6,5 mM CoASH | 0,065 mM |
| 0,005 ml | 54 mM Acetylphosphat | 0,54 mM |
| 0,005 ml | Malat-Dehydrogenase (1 mg/ml) | |
| 0,005 ml | Fumarase (0,5 mg/ml) | |

Die Acetylphosphat-Lösung ist auch bei 0 $^{o}$C nur wenige Stunden stabil; sie wurde deshalb immer unmittelbar vor Beginn der Bestimmungen frisch angesetzt. Acetylphosphat wurde dem Ansatz kurz vor dem Start der Reaktion unter kontrollierten Bedingungen zugesetzt.

Nach MDH-Zugabe wurde in malathaltigen Proben der Anstieg der Extinktion bei 365 nm (Raumtemperatur) im Zeiss PL4-Photometer

verfolgt und über einen angeschlossenen TE-Wandler mit einem Servogor S-Kompensationsschreiber (Fa. Metrawatt AG) aufgezeichnet. Wenn keine weitere Extinktionszunahme erfolgte, wurde Fumarase zugesetzt und wiederum der Extinktionsanstieg verfolgt, bis keine weitere Änderung mehr eintrat. Aus $\Delta E_{365nm}$ wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten für reduziertes APAD $\varepsilon_{366nm} = 9,1\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ (KRÖGER, 1974) die Fumarat- bzw. Malatkonzentration in den Proben berechnet.

5.6. Bestimmung von Acetat mit der Acetyl-CoA-Synthetase (nach Fa. BOEHRINGER, persönliche Mitteilung)

Die Bestimmung beruht auf folgenden Reaktionen:

1) Acetat + ATP + CoA $\xrightarrow{ACS}$ Ac-CoA + AMP + PP

2) AMP + ATP $\xrightarrow{MK}$ 2 ADP

3) 2 ADP + 2 PEP $\xrightarrow{PK}$ 2 ATP + 2 Pyruvat

4) 2 Pyruvat + 2 $NADH_2$ $\xrightarrow{LDH}$ 2 Lactat + 2 NAD

(ACS = Acetyl-CoA-Synthetase, MK = Myokinase, PK = Pyruvat-Kinase, LDH = Lactat-Dehydrogenase)

Bei der Berechnung ist zu berücksichtigen, daß pro 1 mol Acetat 2 mole $NADH_2$ verbraucht werden.

Der Testansatz enthielt in 1 ml:

| | | Konz. im Test |
|---|---|---|
| 0,81 ml | 0,1 M TEA-HCl-Puffer pH 7,0 | 81 mM |
| 0,02 ml | 13 mM CoASH | 0,26 mM |
| 0,01 ml | 23 mM ATP | 0,23 mM |
| 0,05 ml | 20 mM PEP, | 1 mM |
| | 0,1 M KCl | 5 mM |
| | 0,03 M $MgSO_4$ | 1,5 mM |
| 0,05 ml | 14 mM $NADH_2$ | 0,7 mM |
| 0,01 ml | Probe (bis 5 mM Acetat) | bis 0,05 mM |
| 0,01 ml | $H_2O$ bidest. | |

0,01 ml Lactat-Dehydrogenase (1 mg/ml)
0,01 ml Pyruvat-Kinase (1 mg/ml)
0,01 ml Myokinase (2 mg/ml)
0,01 ml Acetyl-CoA-Synthetase (10 mg/ml)

Die Acetyl-CoA-Synthetase (Handelspräparat 5 mg/20 mg Lyophilisat) wurde in 0,5 ml 0,1 M TEA-HCl-Puffer pH 8,0 gelöst und bei -20 °C aufbewahrt. Vor dem Start mit Acetyl-CoA-Synthetase wurden die Ansätze mindestens 15 Minuten bei 25 °C inkubiert, bis keine Blindreaktion mehr zu verzeichnen war. Die Extinktionsabnahme wurde bei 365 nm (d = 1 cm) und 25 °C gemessen.

Wegen des Acetat-Gehalts der Reagenzien wurde zu jeder Testreihe ein Leerwert bestimmt. Aus den korrigierten ΔE-Werten wurde die Acetatkonzentration in den Proben errechnet. Zur Auswertung aller $NADH_2$-gekoppelten Bestimmungen wurde der Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{366\ nm} = 3{,}3\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ verwendet.

5.7. Bestimmung von Succinat mit der Succinyl-CoA-Synthetase
(Fa. BOEHRINGER, persönliche Mitteilung)

Die enzymatische Bestimmung von Succinat beruht auf folgendem Prinzip:

$$\text{Succinat} + \text{GTP} + \text{CoA} \xrightarrow{\text{SCS}} \text{Succinyl-CoA} + \text{GDP} + \text{P}$$

$$\text{GDP} + \text{PEP} \xrightarrow{\text{PK}} \text{GTP} + \text{Pyruvat}$$

$$\text{Pyruvat} + NADH_2 \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Lactat} + \text{NAD}$$

(SCS = Succinyl-CoA-Synthetase, PK = Pyruvat-Kinase, LDH = Lactat-Dehydrogenase)

Der Testansatz enthielt in 1 ml:

| | | Konz. im Test |
|---|---|---|
| 0,80 ml | 0,1 M Glycylglycin-Puffer pH 8,4 | 80 mM |
| | 6 mM $MgCl_2$ | 4,8 mM |
| 0,05 ml | 13 mM CoASH | 0,65 mM |
| 0,05 ml | 11 mM GTP, 19 mM PEP | 0,55 mM bzw. 0,95 mM |

| | | Konz. im Test |
|---|---|---|
| 0,05 ml | 14 mM $NADH_2$ | 0,7 mM |
| 0,02 ml | Lactat-Dehydrogenase (1 mg/ml)/ Pyruvat-Kinase (3 mg/ml) | |
| 0,01 ml | Probe (bis 10 mM Succinat) | bis 0,1 mM |
| 0,01 ml | $H_2O$ bidest. | |
| 0,01 ml | Succinyl-CoA-Synthetase (5 mg/ml) | |

Die Extinktionsabnahme wurde bei 365 nm (d = 1 cm) und 25 °C gemessen. Zu allen Testreihen wurde ein Leerwert bestimmt. Die Ansätze wurden vor dem Start mit Succinyl-CoA-Synthetase mindestens 15 Minuten bei 25 °C inkubiert, bis eine gelegentlich zu beobachtende Blindreaktion zum Stillstand gekommen war.

5.8. Bestimmung von Formiat mit der Formyl-THF-Synthetase (ANDREESEN, persönliche Mitteilung)

Die Formyl-THF-Synthetase bildet in ATP-abhängiger Reaktion aus Formiat und Tetrahydrofolsäure Formyl-THF, die in saurer Lösung nichtenzymatisch in 5,10-Methenyl-THF umgewandelt wird. Methenyl-THF kann auf Grund ihrer Absorption bei 350 nm bestimmt werden ($\varepsilon_{350\ nm}$ = 24,9 $mM^{-1}$ $cm^{-1}$; RABINOWITZ und PRICER, 1957).
Der Testansatz enthielt in 0,75 ml:

| | | Konz. im Test |
|---|---|---|
| 0,020 ml | Gemisch aus 14 M Mercaptoäthanol und | 0,19 M |
| | 1 M TEA-HCl-Puffer pH 8,0 (1 : 1) | 0,013 M |
| 0,075 ml | 1 M TEA-HCl-Puffer pH 8,0 | 0,1 M |
| 0,075 ml | 0,1 M $MgCl_2$ | 0,01 M |
| 0,075 ml | 50 mM ATP | 5 mM |
| 0,300 ml | 1 mM L-THF | 0,4 mM |
| 0,050 ml | 0,1 M $NH_4Cl$ | 6,6 mM |
| 0,005 ml | gereinigte Formyl-THF-Synthetase aus C. thermoaceticum | |
| 0,150 ml | Probe (bis 1 mM Formiat) | bis 0,2 mM |

Die Reaktion wurde durch Zugabe der Probe gestartet. Inkubation der Ansätze erfolgte bei 50 °C im Wasserbad. Nach 5, 10, 20 und

30 Minuten wurden 0,2 ml-Aliquots entnommen und in 0,6 ml 0,36 N HCl abgestoppt. Nach frühestens 10 Minuten wurde die Extinktion der Ansätze gegen einen Leerwert ohne Enzym bei 350 nm (d = 1 cm) gemessen. Die nach 20 bzw. 30 Minuten entnommenen Proben lieferten identische Werte. Die Formiatkonzentration in den Ausgangslösungen wurde unter Berücksichtigung der Verdünnung mittels des oben genannten Extinktionskoeffizienten berechnet.

5.9. Fructose-Bestimmung (nach SIEBERT, 1969)

Reagens: 0,2 g Anthron (9,10-Dihydro-9-oxoanthracen) wurden mit 8 ml absolutem Alkohol sowie 30 ml $H_2O$ bidest. gemischt und im Eisbad kühl gehalten. 100 ml konzentrierte $H_2SO_4$ wurden langsam hinzugefügt. Das Reagens, das rein gelb sein muß, ist im Kühlschrank mehrere Wochen haltbar.

Bestimmung: Je 5 ml Anthronreagens wurden in Reagenzgläser pipettiert. Die Ansätze wurden im Eisbad mit 0,5 ml Probe überschichtet und gut gemischt. Dann wurden sie 7 Minuten im kochenden Wasserbad inkubiert und im Eisbad abgekühlt. Die Extinktion wurde bei 620 nm (d = 1 cm) gegen einen Leerwert gemessen. Eine Eichkurve wurde mit 0,1 - 0,5 µmolen Fructose pro Ansatz aufgenommen.

5.10. Bestimmung des molaren Ertragskoeffizienten $Y_m$ (STOUTHAMER, 1969)

Der molare Ertragskoeffizient $Y_m$ gibt an, wieviel Trockengewicht (in g) pro mol Substratumsatz beim Wachstum gebildet wird. Bei Organismen, die nach Erreichen der stationären Phase lysieren, wird der Wert aus der Trockengewichtszunahme in Relation zum Substratverbrauch während der log-Phase berechnet (vgl. Experimente und Ergebnisse Kap. 1.1.2.1.).

Verfahren: Der Trockengewichtsanstieg während verschiedener Wachstumsintervalle (1 - 5 Stunden) und die Substratabnahme im gleichen Zeitraum wurden den Wachstumskurven entnommen. Die Werte

wurden gegeneinander aufgetragen und graphisch gemittelt (vgl. Abb. 7). Beim Wachstum auf Fumarat wurde Malatbildung bzw. -verbrauch während des Fumaratumsatzes entsprechend berücksichtigt.

## 6. Gärversuche mit ruhenden Zellen

Für die Gärversuche wurden die Zellen im allgemeinen auf dem Substrat angezogen, das auch zur Vergärung eingesetzt werden sollte. Die einzige Ausnahme bildeten die Versuche zur Fumaratvergärung durch Zellen, die auf Fructose gewachsen waren.

1 - 2 g frisch geerntete, nicht gewaschene Zellen wurden in 20 - 60 ml 57 mM K-Phosphat-Puffer pH 8, 1 mM DTE unter ständiger Begasung mit $O_2$-freiem Stickstoff resuspendiert. Sollte die Gärung in Gegenwart von Bicarbonat oder Formiat untersucht werden, enthielt der Puffer zusätzlich 120 mM Na-Bicarbonat bzw. 120 mM Na-Formiat. Nach Zusatz von 0,1 - 0,2 M Substrat (Fumarat bzw. Malat) lag die optische Dichte bei 600 nm zwischen 5,0 und 13,0. Die 10- bzw. 20 ml-Ansätze wurden in Reagenzgläsern unter $O_2$-freiem Stickstoff 4 - 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. In Abständen von 1 - 2 Stunden wurden mit einer Spritze 1 ml-Proben entnommen. Nach Messung der Trübung bei 600 nm und mikroskopischer Kontrolle wurden die Zellen abzentrifugiert (10 Minuten, 15 000 x g ; Sorvall RC2-B-Zentrifuge). Die Überstände wurden bis zur Bestimmung der Säuren bei -20 °C aufbewahrt.

### 6.1. Vergärung von 1,4-$^{14}$C-Fumarat

Die Versuche wurden in zweiarmigen Warburggefäßen durchgeführt, die mit Serumstopfen (Fa. A.H. Thomas Comp., Philadelphia) verschlossen wurden. Mit Hilfe von Injektionsnadeln (sterile Einmalnadeln, Fa. Henke, Tuttlingen) wurden die Ansätze mit $O_2$-freiem Stickstoff begast.

Die Gefäße enthielten

im Hauptraum: 1,8 ml Zellsuspension ($OD_{600}$ = 13) in 57 mM K-Phosphat-Puffer pH 8,0, 1mM DTE

im Seitenarm 1: 0,2 ml 1 M Fumarat (0,5 µCi 1,4-$^{14}$C-Fumarat), Konz. im Test: 0,1 M

im Seitenarm 2: 0,2 ml 4 N $H_3PO_4$

im Zentralzylinder: 0,2 ml 1,8 N NaOH; Filterpapierstreifen

Vor dem Start mit Substrat wurde 20 Minuten bei 37 °C mit $O_2$-freiem Stickstoff begast. Dabei wurden die Gefäße in einer Rund-Warburgapparatur (Fa. Braun, Melsungen) geschüttelt. Die Ansätze wurden sofort nach dem Start bzw. nach 4 Stunden Inkubation (ohne Schütteln) durch Zukippen der Phosphorsäure abgestoppt. Anschließend wurden sie zur Überführung des freigesetzten $CO_2$/$^{14}CO_2$ in die KOH-Lösung 60 Minuten geschüttelt. Durch Zentrifugation bei 10 000 x g (10 Minuten) wurden die Zellen abgetrennt. Im Überstand wurden Fumarat, Succinat und Acetat enzymatisch bestimmt.

6.1.1. Radioaktivitätsmessungen

Jeweils 0,2 ml carbonathaltige Lösung aus dem Zentralzylinder der Warburggefäße bzw. 0,2 ml-Aliquots des Reaktionsansatzes wurden in Plastikfläschchen mit 10 ml Aquasol-Lösung (Fa. New England Nuclear, Boston, Massachusetts) überführt. Die klare Scintillationsflüssigkeit enthielt 10 Teile Aquasol und 1 Teil $H_2O$, die kurz vor Gebrauch gemischt wurden. Nach dem Abkühlen wurden die Proben im Tricarb-Scintillations-Spektrometer Modell 3320 (Fa. Packard Instruments, Downers Grove, Illinois) ausgezählt.

Zur getrennten Bestimmung der Radioaktivität im Acetat wurden die Ansätze (pH 2) nach dem Abzentrifugieren der Zellen quantitativ in die Wasserdampfdestillationsapparatur nach MARKHAM (1942) überführt. Es wurde etwa das 15-fache Probevolumen überdestilliert. Das Destillat wurde in einem eisgekühlten Kolben aufgefangen und mit 0,1 N NaOH titriert. Anschließend wurde die acetathaltige Lösung im Rotationsverdampfer (Fa. Büchi, Flawil, Schweiz) etwa auf das

ursprüngliche Probevolumen eingeengt. Je 0,2 ml des Destillats und des Rückstandes wurden in Plastikzählfläschchen mit 10 ml Aquasol-Lösung überführt und nach dem Abkühlen ausgezählt.

7. Extraktherstellung

Die Extrakte wurden unter anaeroben Bedingungen hergestellt. Die Puffer wurden vor Gebrauch mit $O_2$-freiem Stickstoff (vgl. Kap. 5) durchblasen. Inkubation erfolgte ebenfalls unter Begasung mit Stickstoff in Zentrifugenröhrchen oder anderen Gefäßen, die mit Serumkappen dicht verschlossen waren. Zum Ein- und Ausleiten des Gases dienten dünne Injektionsnadeln. Beim Aufnehmen von Zellen, Sphäroplasten oder Partikeln in Puffer wurde Stickstoff über die Oberfläche der Suspension geleitet.

7.1. Zellaufschluß mit der French-Presse

2 g frisch geerntete oder eingefrorene, nicht gewaschene Zellen wurden in 5 - 10 ml 0,1 M K-Phosphat-Puffer pH 7,6, 1 mM DTE unter $O_2$-freiem Stickstoff resuspendiert und mit einer kleinen Spatelspitze DNase versetzt. Die Suspension wurde in eine auf 5 - 10 °C vorgekühlte French-Presse (Fa. Aminco, Silver Springs, Maryland) gefüllt und mit einem Druck von 80 kp/cm$^2$ langsam durch die feine Öffnung gepreßt. Der so gewonnene Extrakt wurde 40 Minuten bei 50 000 x g (Sorvall RC2-B-Zentrifuge) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in Zentrifugenröhrchen, die mit Serumstopfen verschlossen wurden, abgegossen und anaerob bei 0 - 4 °C aufbewahrt. Das Pellet wurde in 1 - 5 ml 0,1 M K-Phosphat-Puffer pH 7,6, 1 mM DTE resuspendiert und ebenfalls in ein anaerob verschließbares Röhrchen überführt.

Für verschiedene Versuche wurde der Rohextrakt folgendermaßen fraktioniert: Der French-Press-Extrakt wurde zur Abtrennung ganzer Zellen 15 Minuten bei 8000 x g zentrifugiert. Anschließend erfolgte zweistündige Zentrifugation bei 100 000 x g in einer Christ-Omikron-Zentrifuge (Fa. Heraeus-Christ, Osterode/Harz). Das so erhaltene Pellet wurde in 2 - 3 ml 50 mM K-Phosphat-Puffer

pH 7,6 aufgenommen. Die konzentrierte Partikel-Suspension oder der nicht aufgetrennte 8000 x g-Überstand wurde zur Aceton-HCl-Extraktion des Häms verwendet (Kap. 12).

Hydrogenasehaltige Rohextrakte von C. pasteurianum für manometrische Messungen und Extrakte von C. thermoaceticum zum Nachweis des Cytochroms wurden ebenfalls durch French-Press-Aufschluß hergestellt.

## 7.2. Lysozymaufschluß

### 7.2.1. Lysozymbehandlung in 0,3 M K-Phosphat-Puffer pH 7,6

1 g frisch geerntete, nicht gewaschene Zellen von C. formicoaceticum wurden in 6 ml 0,3 M K-Phosphat-Puffer pH 7,6, 1 mM DTE unter Stickstoffatmosphäre resuspendiert. Nach Zusatz von 1 mg Lysozym/ml wurde 3 Stunden bei 37 °C unter Begasung mit $O_2$-freiem Stickstoff inkubiert. Die so entstandenen abgerundeten Sphäroplasten wurden durch Zentrifugation bei 50 000 x g (20 Minuten, 0 - 4 °C) sedimentiert. Der gelbliche Überstand (EI) wurde dekantiert. Die Sphäroplasten wurden in 10 ml 0,15 M K-Phosphat-Puffer pH 7,6, 1 mM DTE aufgenommen, mit wenig DNase versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Stickstoff bis zur vollständigen Lyse stehengelassen. Dann wurde 30 Minuten bei 50 000 x g (0 - 4 °C) zentrifugiert. Der gelblich-braune Überstand (EII) wurde abgegossen, das Pellet (PII) wurde in 5 ml des verwendeten 0,15 M Puffers resuspendiert. Alle Fraktionen (EI, EII, PII) wurden unter Sauerstoffausschluß bei 0 - 4 °C aufbewahrt.

### 7.2.2. Lysozymbehandlung in 20 mM HEPES-Puffer pH 8,0, 0,6 M Saccharose mit anschließender Lyse durch osmotischen Schock

2 g frisch geerntete, nicht gewaschene Zellen wurden in 10 ml 20 mM HEPES-KOH-Puffer pH 8,0, 1 mM DTE, 0,6 M Saccharose unter Stickstoff resuspendiert und nach Zusatz von 1 mg Lysozym/ml 30 - 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die so entstandenen, im

Mikroskop als ovale oder abgerundete Gebilde erkennbaren Sphäroplasten wurden abzentrifugiert (20 Minuten, 50 000 x g , 0 - 4 °C). Der blaßgelbe Überstand (Sphäroplastenüberstand EI) wurde sofort in ein Zentrifugenröhrchen überführt und anaerob bei 0 - 4 °C aufbewahrt. Die Sphäroplasten wurden in 10 ml 20 mM HEPES-KOH-Puffer pH 8, 1 mM DTE, 0,5 mM $MgCl_2$ aufgenommen und nach Zusatz von etwa 1 mg DNase 10 - 20 Minuten bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Lyse inkubiert. Das Lysat wurde entweder ohne vorangehende Auftrennung verwendet oder 30 Minuten bei 50 000 x g zentrifugiert. Der Überstand (= lösliche Fraktion EII) und das in 5 ml 20 mM HEPES-Puffer resuspendierte Pellet (= Partikelfraktion PII) wurden anaerob bei 0 - 4 °C aufbewahrt.

### 7.2.3. Lysozymaufschluß in 20 mM HEPES-Puffer pH 8,0 ohne Saccharose

Für einige Untersuchungen wurden möglichst schonend hergestellte Extrakte benötigt, die Membranen und lösliche Bestandteile enthielten. Dazu wurden 2 g frisch geerntete Zellen in 5 - 10 ml 20 mM HEPES-KOH-Puffer pH 8,0, 1 mM DTE, 1 - 5 mM $MgCl_2$ suspendiert, mit 1 mg Lysozym/ml und wenig DNase (ca. 1 mg/10 ml) versetzt und unter Stickstoff 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Noch nicht lysierte Zellen wurden durch Zentrifugation bei 8000 x g (15 Minuten, 0 - 4 °C) abgetrennt. Für die Versuche zum Nachweis einer ATPase wurde der Extrakt anaerob bei Raumtemperatur, andernfalls bei 0 - 4 °C aufbewahrt. Falls notwendig erfolgte weitere Fraktionierung durch Zentrifugation bei 50 000 x g (30 Minuten) oder 100 000 x g (2 Stunden).

Der Aufschluß wurde in 20 mM Tris-HCl-Puffer pH 8, 1 mM DTE, 5 mM $MgCl_2$ unter gleichen Bedingungen durchgeführt, wenn im Extrakt $NADH_2$-Fumarat-Reduktase-Aktivität nachgewiesen werden sollte. Die dazu verwendeten Zellen wurden bei einer Dichte von etwa 0,6 (600 nm) geerntet (Mitte der log-Phase, 14 Stunden).

7.2.4. Lysozymbehandlung in 20 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0 mit Saccharose und EDTA (nach HEPPEL, 1971)

3 g frisch geerntete, auf Fumarat und Formiat angezogene Zellen wurden einmal mit 10 ml eines anaeroben 20 mM Tris-HCl-Puffers pH 8,0, 1 mM DTE gewaschen und in 120 ml dieses Puffers mit 0,6 M Saccharose und 1 mM EDTA unter ständiger Begasung mit Stickstoff resuspendiert. Nach Zusatz von 0,1 mg Lysozym/ml wurde 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Sphäroplasten durch Zentrifugation bei 16 000 x g (20 Minuten, 0 - 4 °C) sedimentiert und unter anaeroben Bedingungen in 100 ml 20 mM Tris-HCl-Puffer pH 8, 1 mM DTE, 1 mM $MgCl_2$ mit 1 mg DNase aufgenommen. Nach vollständiger Lyse (ca. 10 Minuten) erfolgte Zentrifugation bei 27 000 x g (30 Minuten, 0 - 4 °C). Die erhaltenen Fraktionen wurden folgendermaßen bezeichnet: Sphäroplastenüberstand = EI, Extrakt nach Lyse = EII, Partikelfraktion nach Lyse = PII.

8. Osmotischer Schock ganzer Zellen

8.1. Plasmolyse in 20 mM Tris-Puffer mit Saccharose und EDTA und osmotischer Schock in 1 mM $MgCl_2$-Lösung (nach HEPPEL, 1971)

2,8 g frische, nicht gewaschene Zellen nach Anzucht auf Fumarat und Formiat wurden unter Stickstoff in 200 ml 20 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,7, 1 mM DTE, 0,1 mM EDTA und 0,6 M Saccharose suspendiert, bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert, abzentrifugiert (20 Minuten, 16 000 x g ) und in 200 ml kalter 1 mM $MgCl_2$-Lösung aufgenommen. Nach kurzer Inkubation bei Raumtemperatur wurde wiederum zentrifugiert (Überstand = Schockpuffer, "shock fluid"). Anschließend wurden die ganzen Zellen in 10 ml 20 mM HEPES-KOH-Puffer pH 8, 1 mM DTE resuspendiert und mit 1 mg Lysozym/ml 60 Minuten bis zur vollständigen Lyse bei 37 °C inkubiert. Der Extrakt wurde nicht aufgetrennt. Bezeichnung der erhaltenen Fraktionen: Überstand der ersten Zentrifugation (Tris/EDTA/Saccharose) = EI o. S. (o. S. = osmotischer Schock), Überstand der zweiten Zentrifugation ($MgCl_2$) = EII o. S. ("shock fluid"), Extrakt nach der Inkubation mit Lysozym = Gesamtextrakt.

8.2. Plasmolyse in 20 mM HEPES-Puffer mit Saccharose ohne EDTA und osmotischer Schock im gleichen Puffer ohne Saccharose

2,5 g frisch geerntete, nicht gewaschene Zellen nach Anzucht auf Fumarat und Formiat wurden unter Begasung mit Stickstoff in 10 ml 20 mM HEPES-KOH-Puffer pH 8, 1 mM DTE, 1 mM $MgCl_2$, 0,6 M Saccharose suspendiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert (10 Minuten 13 000 x g ; Überstand = EI o. S.) und unter Stickstoff in 10 ml 20 mM HEPES-KOH-Puffer pH 8, 1 mM DTE, 1 mM $MgCl_2$ aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (10 Minuten, 27 000 x g ; Überstand = EII o. S., Schockpuffer) wurden die Zellen in 10 ml des Puffers resuspendiert und mit Lysozym (1 mg/ml) und 1 mg DNase 30 Minuten inkubiert (Gesamtextrakt).

9. Proteinbestimmung in Zellextrakten

In Extrakten wurde Protein nach der von BEISENHERZ et al. (1953) beschriebenen Methode bestimmt. Je nach Proteingehalt wurden 0,1 - 0,5 ml Extrakt eingesetzt. Nach Zugabe von Trichloressigsäure wurden die Ansätze bis zum vollständigen Ausflocken des Proteins bei Raumtemperatur oder bei 37 °C inkubiert. Eichkurven wurden mit 1 - 5 mg Rinderserumalbumin pro Ansatz aufgenommen.

10. Bestimmung von Enzymaktivitäten

Enzymaktivitäten wurden mit Hilfe photometrischer oder manometrischer Methoden bestimmt. Die Aktivität der Enzyme wurde im Bereich linearer Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Extraktmenge ermittelt. Spezifische Aktivitäten wurden in Einheiten (E) pro mg Protein angegeben. 1 Einheit entspricht dem Umsatz von 1 µmol Substrat pro Minute unter den jeweils angegebenen Testbedingungen.

## 10.1. Manometrische Messungen

Manometrische Messungen erfolgten in einer Rund-Warburg-Apparatur (Fa. Braun, Melsungen) bei 37 °C und einer Schüttelfrequenz von 120/Minute. Die Versuche wurden in zweiarmigen 15 ml-Warburggefäßen durchgeführt. Während die Testbestandteile in die Gefäße gegeben wurden, wurde mit $O_2$-freiem Stickstoff begast. Extraktzugabe erfolgte immer erst kurz vor dem Anschluß an die Manometer. Der zum Begasen verwendete Wasserstoff wurde durch eine der Gasverteilungsvorrichtung vorgeschaltete Sauerstoff-Absorptionslösung (STRAUSS und NICKERSON, 1961) geleitet (siehe unten).

Die Gefäße wurden zunächst 5 Minuten geschüttelt. Dann wurde der Inhalt des 1. Seitenarms (C. pasteurianum-Extrakt) in den Hauptraum gekippt und weitere 5 Minuten mit $H_2$ durchströmt. Nach dem Schließen der Hähne wurde 15 Minuten geschüttelt, bis sich Druckkonstanz in den Gefäßen eingestellt hatte, und der Nullwert abgelesen. Die Reaktion wurde durch Einkippen des Extrakts aus dem 2. Seitenarm gestartet. Der $H_2$-Verbrauch wurde in Abständen von 5 Minuten abgelesen.

Bestimmung der Fumarat-Reduktase-Aktivität mit reduziertem MV bzw. FMN als Elektronendonator (nach BERNATH und SINGER, 1962; HAUBER und SINGER, 1967)

| | | Konz. im Test |
|---|---|---|
| Hauptraum: | 0,35 ml 0,3 M K-Phosphat-Puffer pH 7,6 | 52 mM |
| | 0,1 ml 1 M Fumarat | 50 mM |
| | 0,3 ml 50 mM FMN | 7,5 mM |
| | (bzw. 0,2 ml 0,1 M MV | 10 mM) |
| | 0,85 - 1,05 ml $H_2O$ bidest. | |
| Seitenarm 1: | 0,2 ml C. pasteurianum-Extrakt | |
| Seitenarm 2: | 0,1 - 0,2 ml Extrakt (0,01 - 2,5 mg Protein) | |

Bei jeder Testreihe wurde ein Kontrollansatz ohne Fumarat mitgeführt.

Der Extrakt aus C. pasteurianum diente der Reduktion des FMN bzw. des MV durch $H_2$. C.pasteurianum enthält eine aktive Hydrogenase, aber keine Fumarat-Reduktase (PECK et al., 1957).

Zusammensetzung der $O_2$-Absorptionslösung

| | |
|---|---|
| Riboflavin | 18,82 mg |
| EDTA | 75 mg |
| $H_2O$ bidest. | 1000 ml |
| pH 8 | |
| Methylenblau | 30 - 40 mg |

Methylenblau wurde in kleinen Portionen zugegeben, bis die Lösung eine dunkelgrüne Farbe zeigte. Sie wurde bei 4 °C in einer luftdicht verschlossenen Flasche aufbewahrt. Zur Sauerstoffabsorption wurde eine Gaswaschflasche etwa zur Hälfte mit der Lösung gefüllt und während der Begasung mit einer Glühlampe belichtet. Das $O_2$-Absorptionsmittel wurde so lange verwendet, bis eine irreversible Blaufärbung anzeigte, daß die Kapazität erschöpft war.

## 10.2. Photometrische Messungen

Photometrische Messungen wurden bei 365 und 546 nm im Zeiss PL4-Photometer, bei anderen Wellenlängen im Zeiss PM4-Spektralphotometer durchgeführt. Beide Geräte waren über einen TE-Wandler mit einem Servogor S-Kompensationsschreiber RE 541 (Fa. Metrawatt AG) verbunden.

Die Bestimmungen erfolgten bei 37 °C in anaeroben, mit Serumstopfen verschlossenen 1 cm-Küvetten. Temperaturkonstanz in den Küvetten wurde durch einen angeschlossenen Thermostaten (Fa. Haake, Berlin) erzielt.

Die Küvetten wurden vor dem Start der Reaktion 20 Minuten mit $O_2$-freiem Stickstoff durchperlt. Alle Testbestandteile wurden unter Stickstoff aufbewahrt und außer dem Puffer mit Mikroliter-

spritzen (Fa. Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) den anaeroben Ansätzen in der angegebenen Reihenfolge zugesetzt. Bei jeder Testreihe wurden Kontrollmessungen ohne die Substrate durchgeführt. $NADH_2$-Verbrauch auf Grund von $NADH_2$-Oxidase-Aktivität wurde gegebenenfalls in einer Korrektur berücksichtigt.

10.2.1. $NADH_2$-Fumarat-Reduktase (verändert nach SINGH und RAGG, 1975)

Der Testansatz enthielt in 1 ml:

| | | Konz. im Test |
|---|---|---|
| 0,81 - 0,84 ml | 0,1 M Tris-HCl-Puffer 7,6, | 81 - 84 mM |
| | 1 mM DTE | 0,8 mM |
| 0,1 ml | 0,1 M $MgCl_2$ | 10 mM |
| 0,04 ml | 14 mM $NADH_2$ | 0,56 mM |
| 0,01 - 0,04 ml | Extrakt (0,25 - 1,0 mg Protein) | |
| 0,01 ml | 1 M Fumarat | 10 mM |

Nach Zugabe des Extrakts wurden die Ansätze mindestens 20 Minuten mit Stickstoff begast. Dadurch konnte die störende $NADH_2$-Oxidase-Aktivität auf einen niedrigen Wert gesenkt werden. Zusatz von $MgCl_2$ war nicht unbedingt erforderlich. Der $NADH_2$-Verbrauch wurde bei 365 nm und 37 °C gemessen ($\varepsilon_{366\ nm} = 3{,}3\ mM^{-1}\ cm^{-1}$).

10.2.2. Succinat-Dehydrogenase EC 1.3.99.1

(verändert nach BERNATH und SINGER, 1962; VEEGER et al., 1969)

Der Testansatz enthielt in 1 ml:

| | | Konz. im Test |
|---|---|---|
| | 0,7 ml 0,1 M K-Phosphat-Puffer pH 7,6 | 70 mM |
| 0,01 - 0,16 ml | $H_2O$ bidest. | |
| | 0,07 ml 1 mM DCPIP | 0,07 mM |
| bzw. | 0,03 ml 10 mM NAD | 0,3 mM |
| bzw. | 0,07 ml 1 mM TTC | 0,07 mM |

| | | Konz. im Test |
|---|---|---|
| bzw. | 0,02 ml 100 mM $K_3Fe(CN)_6$ | 2 mM |
| | 0,02 ml 1 mM PMS [1)] | 0,02 mM |
| 0,02 - 0,1 ml | Extrakt | |
| 0,1 ml | 0,1 M Succinat | 10 mM |

[1)] PMS wurde nicht zugesetzt, wenn $K_3Fe(CN)_6$ als Elektronenakzeptor diente.

Die Bestimmungen mit DCPIP, NAD und TTC erfolgten jeweils mit und ohne PMS. Alle Messungen wurden unter anaeroben Bedingungen bei Raumtemperatur und folgenden Wellenlängen durchgeführt:

DCPIP (± PMS): 578 nm; NAD (± PMS): 365 nm;
TTC (± PMS) : 490 nm; $K_3Fe(CN)_6$ : 400 nm

10.2.3. Fumarase EC 4.2.1.2 (verändert nach HILL und BRADSHAW, 1969)

Der Testansatz enthielt in 1 ml:

| | Konz. im Test |
|---|---|
| 0,95 - 0,965 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,8 | 96 mM |
| 0,03 ml 0,5 M L-Malat | 15 mM |
| 0,005 - 0,02 ml Extrakt | |

Der Test wurde unter anaeroben Bedingungen bei 250 nm und 37 °C durchgeführt. Die Aktivität wurde mittels des Extinktionskoeffizienten für Fumarat $\varepsilon_{250\ nm} = 1{,}45\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ berechnet (BERGMEYER, 1974).

10.2.4. Malat-Dehydrogenase (Malat:NAD-Oxidoreduktase) EC 1.1.1.37 (BOEHRINGER Information, 1970)

Der Testansatz enthielt in 1 ml:

| | Konz. im Test |
|---|---|
| 0,93 - 0,94 ml 0,1 M K-Phosphat-Puffer pH 7,5 | 93 - 94 mM |
| 0,03 ml 15 mM Oxalacetat | 0,45 mM |

| | Konz. im Test |
|---|---|
| 0,02 ml 14 mM $NADH_2$ | 0,28 mM |
| 0,01 - 0,02 ml Extrakt | |

Die Extinktionsabnahme wurde bei 365 nm und 37 °C verfolgt. Die Reaktion wurde auch mit L-Malat (0,45 mM) und NAD (0,3 mM) in 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,8 gemessen.

10.2.5. Malat-Enzym (Malat:NAD(P)-Oxidoreduktase, decarboxylierend) EC 1.1.1.38 oder 1.1.1.39 oder 1.1.1.40
Reaktion: Malat ⟶ Pyruvat (verändert nach HSU und LARDY, 1969)

Der Testansatz enthielt in 1 ml:

| | Konz. im Test |
|---|---|
| 0,88 - 0,895 ml 20 mM HEPES-KOH-Puffer, pH 8, | 18 mM |
| 1 mM DTE | 0,9 mM |
| 0,01 ml 0,1 M $MnCl_2$ | 1 mM |
| 0,03 ml 0,5 M L-Malat | 15 mM |
| 0,005 - 0,02 ml Extrakt | |
| 0,06 ml 10 mM NAD bzw. NADP | 0,6 mM |

Der Extinktionsanstieg wurde bei 365 nm und 37 °C gemessen.

Reaktion: Pyruvat ⟶ Malat (verändert nach FRENKEL, 1972)

Der Testansatz enthielt in 1 ml:

| | Konz. im Test |
|---|---|
| 0,635 - 0,655 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,6 | 63 - 65 mM |
| 0,1 ml 0,1 M $MgCl_2$ | 10 mM |
| 0,025 ml 10 mM $NAD(P)H_2$ | 0,25 mM |
| 0,1 ml 0,5 M $KHCO_3$ | 50 mM |
| 0,1 ml 0,1 M Pyruvat | 10 mM |
| 0,02 - 0,04 ml Extrakt | |

Die Extinktionsabnahme wurde bei 365 nm und 37 °C verfolgt. Die Reaktion wurde entweder mit Pyruvat, $KHCO_3$ oder Extrakt gestartet.

10.2.6. Acetat-Kinase EC 2.7.2.1. (verändert nach SCHAUPP und LJUNGDAHL, 1974)

Der Testansatz enthielt in 1 ml:

| | | Konz. im Test |
|---|---|---|
| 0,2 ml | 0,5 M Tris-HCl-Puffer pH 7,4 | 0,1 M |
| 0,4 ml | 2 M Acetat | 0,8 M |
| 0,1 ml | 2 M KCl | 0,2 M |
| 0,163 - 0,167 ml | $H_2O$ bidest. | |
| 0,04 ml | 100 mM ATP | 4 mM |
| 0,04 ml | 100 mM $MgCl_2$ | 4 mM |
| 0,02 ml | 80 mM PEP | 1,6 mM |
| 0,02 ml | 20 mM $NADH_2$ | 0,4 mM |
| 0,002 ml | Pyruvat-Kinase (10 mg/ml) | |
| 0,01 ml | Lactat-Dehydrogenase (10 mg/ml) | |
| 0,001 - 0,005 ml | Extrakt | |

Der $NADH_2$-Verbrauch wurde bei 365 nm und 37 °C gemessen.

10.2.7. Formiat-Dehydrogenase

Der Testansatz enthielt in 1 ml:

| | | Konz. im Test |
|---|---|---|
| 0,1 ml | 1 M K-Phosphat-Puffer pH 7,8 | 100 mM |
| 0,01 ml | 0,1 M DTE | 1 mM |
| 0,05 ml | 0,4 M MV | 20 mM |
| 0,05 ml | 0,4 M Formiat | 20 mM |
| 0,78 - 0,79 ml | $H_2O$ bidest. | |
| 0,001 - 0,01 ml | Extrakt | |

Die Extinktionszunahme wurde bei 600 nm und 37 °C gemessen. Die Reaktion wurde durch Zusatz von Extrakt gestartet. Zur Berechnung der Aktivität wurde der von TRUDINGER (1970) angegebene Extinktionskoeffizient für MV $\varepsilon_{600\ nm} = 11{,}3\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ verwendet.

10.2.8. Alkalische Phosphatase EC 3.1.3.1. (verändert nach BOEHRINGER Information, 1970)

Der Testansatz enthielt in 1 ml:

| | Konz. im Test |
|---|---|
| 0,775 - 0,85 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,5 | 77 - 85 mM |
| 0,1 ml 0,1 M p-Nitrophenylphosphat | 10 mM |
| 0,025 ml 0,2 M $MgCl_2$ | 5 mM |
| 0,025 - 0,1 ml Extrakt | |

Der Extinktionsanstieg infolge der Bildung von p-Nitrophenol wurde bei 405 nm gemessen ($\varepsilon_{405\ nm}$ = 18,5 $mM^{-1}$ $cm^{-1}$). Der Zusatz von $MgCl_2$ war nicht unbedingt erforderlich, bewirkte aber eine Steigerung der Aktivität.

10.3. Endpunktsbestimmungen

10.3.1. Fumarat-Reduktion mit Formiat als Elektronendonator

Die Bestimmung wurde bei 37 °C in mit Serumstopfen verschlossenen Zentrifugenröhrchen unter Stickstoffbegasung durchgeführt.

Der Testansatz enthielt in 1 ml:

| | Konz. im Test |
|---|---|
| 0,58 - 0,59 ml 0,1 M K-Phosphat-Puffer pH 7,6 , | 59 mM |
| 10 mM DTE | 5,9 mM |
| 0,2 ml 0,1 M Formiat | 20 mM |
| 0,1 ml 0,1 M Fumarat | 10 mM |
| 0,1 ml 0,1 M Methylviologen | 10 mM |
| 0,01 - 0,02 ml Extrakt | |

Vor dem Start wurden die Röhrchen mindestens 20 Minuten mit Stickstoff begast. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Extrakt gestartet. Zu jeder Testreihe wurden Kontrollen ohne Fumarat bzw. Formiat oder Methylviologen durchgeführt.

Die Reaktionsansätze wurden nach 0, 2, 4 und 6 Minuten durch Zugabe von 0,2 ml 0,6 M Trichloressigsäure abgestoppt. Das ausge-

fällte Protein wurde abzentrifugiert (10 Minuten, 4000 Upm). Im Überstand wurden jeweils Fumarat, L-Malat und Succinat bestimmt und die formiatabhängige Substratabnahme bzw. Produktbildung ermittelt.

10.3.2. Fumarat-Reduktion mit Pyruvat als Elektronendonator

Die Bestimmung wurde unter den gleichen Bedingungen wie der Test mit Formiat durchgeführt.

Der 1 ml-Testansatz enthielt:

| | Konz. im Test |
|---|---|
| 0,64 ml 0,1 M TEA-HCl-Puffer pH 7,6 | 64 mM |
| 10 mM DTE | 6,4 mM |
| 0,1 ml 0,1 M Pyruvat | 10 mM |
| 0,1 ml 0,1 M Fumarat | 10 mM |
| 0,01 ml 2 mM CoASH | 0,02 mM |
| 0,1 ml 0,1 M MV | 10 mM |
| 0,05 ml Extrakt | |

Die Röhrchen wurden vor dem Start der Reaktion mit Extrakt mindestens 20 Minuten mit Stickstoff durchströmt. Die Reaktion wurde nach 5 bzw. 10 Minuten durch Zusatz von 0,2 ml 0,6 M Trichloressigsäure abgestoppt. Da Pyruvat in saurer Lösung instabil ist, wurde nach dem Ausfällen des Proteins 0,03 ml 4 N NaOH zur Neutralisation zugegeben. Fumarat und Succinat wurden bestimmt, wie in Kap. 5 beschrieben.

Der Ansatz zur Pyruvat-Bestimmung enthielt in 1 ml: 0,1 M TEA-HCl-Puffer pH 7,6, 0,5 mM $NADH_2$, Probe (bis 0,1 mM Pyruvat), 0,01 ml Lactat-Dehydrogenase (5 mg/ml). Der $NADH_2$-Verbrauch wurde bei 365 nm gemessen.

10.3.3. Bestimmung der Adenosintriphosphatase-Aktivität

EC 3.6.1.3.

Die Aktivität des ATP-hydrolysierenden Enzyms wurde durch Bestimmung des freigesetzten Phosphats nach TAUSSKY und SHORR (1953) ermittelt. Der Test wurde in anaerob verschlossenen Röhrchen bei 30 °C durchgeführt.

Der Reaktionsansatz enthielt in 1 ml:

| | Konz. im Test |
|---|---|
| 0,5 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 | 50 mM |
| 0,025 ml 0,2 M ATP | 5 mM |
| 0,025 ml 0,2 M PEP | 5 mM |
| 0,025 ml 0,2 M $MgCl_2$ bzw. $CaCl_2$ | 5 mM |
| 0,03 ml Pyruvat-Kinase (1 mg/ml) | |
| 0,1 ml 10 mM Dinitrophenol (DNP) | 1 mM |
| 0,05 - 0,2 ml Extrakt bzw. Partikel | |
| 0,095 - 0,245 ml $H_2O$ bidest. | |

Die Reaktion wurde durch Extraktzugabe gestartet und nach 5 bis 10 Minuten durch Zusatz von 1 ml 0,6 M Trichloressigsäure abgestoppt. Einem Kontrollansatz zur Bestimmung nichtenzymatischer ATP-Hydrolyse wurde ATP unmittelbar nach der Proteinfällung zugesetzt. Das ausgeflockte Protein wurde durch Zentrifugation abgetrennt (5 Minuten, 4000 Upm). Der Phosphatgehalt im Überstand mußte sofort bestimmt werden, da ATP in saurer Lösung langsam hydrolysiert. Zur Phosphatbestimmung wurden folgende Reagenzien benötigt:

Molybdat-Reagens: 50 g Ammoniummolybdat(VI) $[(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4\,H_2O]$ wurden in 400 ml 10 N $H_2SO_4$ gelöst. Mit $H_2O$ bidest. wurde auf 1000 ml aufgefüllt.

Test-Reagens: 2,5 g $FeSO_4 \times 7\,H_2O$ wurden mit 10 ml Molybdat-Reagens versetzt und mit 40 ml $H_2O$ bidest. verdünnt.

Die Lösung muß in einer braunen Flasche vor Licht geschützt aufbewahrt und täglich frisch angesetzt werden.

1 ml phosphathaltige Probe wurde zu 0,5 ml Test-Reagens gegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur zur Ausbildung des gefärbten Molybdat-Komplexes stehengelassen. Die Extinktion der Proben wurde bei 720 nm (d = 1 cm) gegen den Kontrollansatz gemessen. Die Eichkurve wurde mit 0,05 - 1 µmol o-Phosphat pro Ansatz aufgenommen.

## 11. Spektroskopische Methoden zur Charakterisierung des Cytochroms

Zur Charakterisierung der in C. formicoaceticum und C. thermoaceticum nachgewiesenen Cytochrome wurden Differenzspektren aufgenommen.

### 11.1. Redox-Differenzspektren

Zur Messung der Differenzspektren bei Raumtemperatur und bei -196 °C wurden Partikelsuspensionen in Puffer oder $H_2O$ bidest. mit 2 - 11 mg Protein pro ml verwendet.

Die Extinktionsdifferenz zwischen einer oxidierten und einer reduzierten Probe im Spektralbereich zwischen 700 und 400 nm wurden im Zeiss DMR 21-Spektralphotometer gemessen und mit einem angeschlossenen Schreiber aufgezeichnet. Reduktion der Partikelsuspensionen wurde durch Zugabe einiger Kristalle frischen Na-Dithionits erzielt. Zusätzliche Oxidation der Referenzprobe durch $K_3Fe(CN)_6$ war im allgemeinen bei der Aufnahme von Redox-Differenzspektren unter aeroben Bedingungen nicht erforderlich. Bei den Versuchen zur enzymatischen Reduktion des Cytochroms wurden die Küvetten anaerob gehalten. Dies führte zu schneller endogener Reduktion der Proben und machte die Oxidation des Vergleichsansatzes notwendig. Als physiologische Reduktionsmittel wurden $NADH_2$, Formiat und Lactat eingesetzt.

Differenzspektren bei -196 °C (CHANCE, 1957) wurden mit einem Shimadzu MPS-50L-Doppelstrahlphotometer aufgenommen. Die oxidierten bzw. mit Dithionit reduzierten Proben (11 mg Protein/ml)

wurden in 1 mm-Küvetten in flüssigem Stickstoff eingefroren.

11.2. Pyridin-Hämochrom-Differenzspektren

Pyridin-Hämochrome wurden nach der von FALK (1964) beschriebenen Methode hergestellt. 1 ml einer Partikelsuspension (10 - 20 mg Protein) wurde abzentrifugiert (10 Minuten 50 000 x g). Das Pellet wurde in 1 - 2 ml einer alkalischen Pyridinlösung (0,1 N NaOH mit 25 Vol.-% Pyridin) resuspendiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur extrahiert. Trübe Lösungen wurden anschließend kurz zentrifugiert (10 Minuten, 4000 Upm). Mit dem klaren Überstand wurden Redox-Differenzspektren aufgenommen. Zur Reduktion wurde den Proben wenig kristallines Na-Dithionit zugesetzt.

11.3. Kohlenmonoxid-Differenzspektren

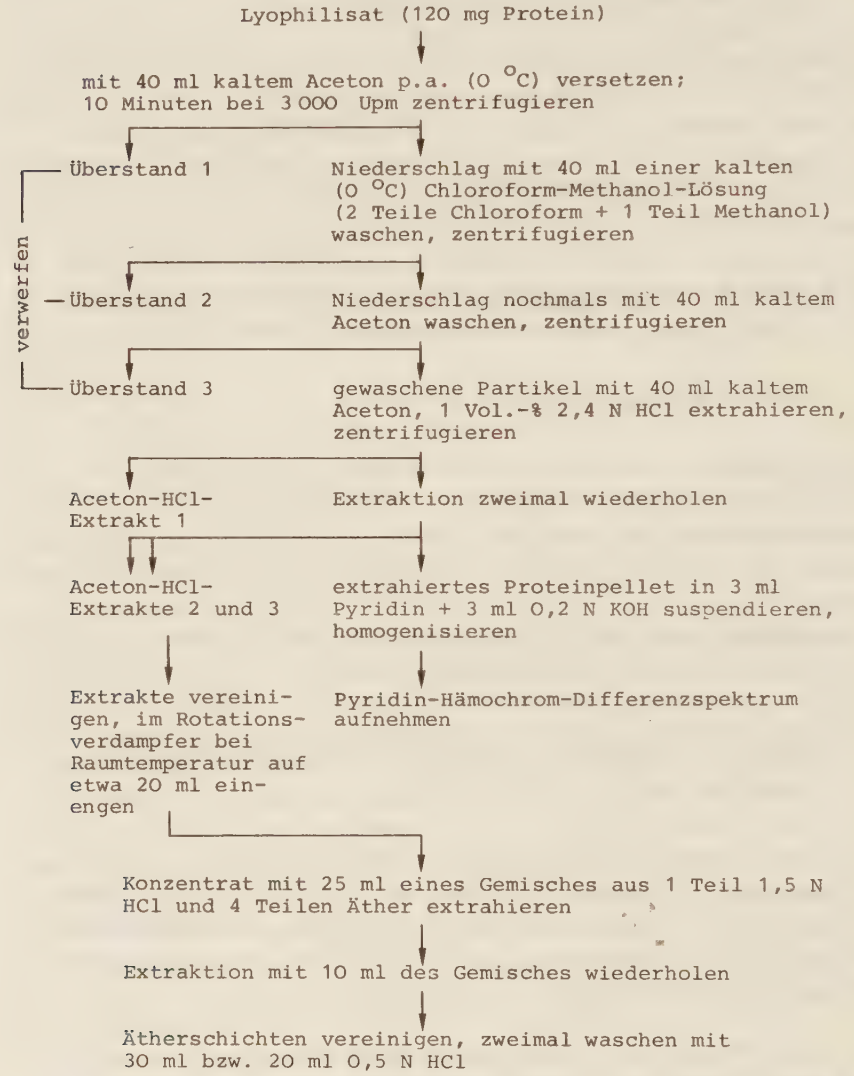
Zur Bestimmung einer Reaktion des Cytochroms mit CO wurden 1 - 2 ml einer Probe mit Dithionit reduziert und in einem Zentrifugenröhrchen unter Lichtausschluß 30 - 40 Sekunden mit CO durchblasen. Anschließend wurde das Differenzspektrum zwischen der mit CO behandelten Probe und einem mit Dithionit reduzierten Vergleichsansatz (ohne CO) aufgezeichnet. Während der Messung wurden die Küvetten mit Serumstopfen verschlossen.

12. Aceton-HCl-Extraktion von nicht kovalent gebundenem Häm (JACOBS und WOLIN, 1963)

Durch Extraktion mit Aceton-HCl-Gemischen lassen sich nicht kovalent gebundene Hämgruppen wie etwa das Protohäm des Cytochroms b aus dem Protein herauslösen. Das über eine Thioätherbrücke gebundene Häm des Cytochroms c bleibt bei dieser Behandlung fest mit dem Protein verbunden.

Verfahren: 4 ml eines nicht aufgetrennten Rohextrakts (Überstand nach Zentrifugation bei 8000 x g, 30 Minuten) mit einem Gesamtproteingehalt von 120 mg wurden gefriergetrocknet.

Das folgende Schema gibt die Extraktionsschritte wieder:



Ätherschicht mit 20 ml 3% (Gewicht/Volumen) NaCl waschen

↓

Ätherschicht im Rotationsverdampfer abdampfen

↓

Niederschlag in 1 ml Pyridin + 1 ml 0,2 N KOH lösen

↓

Pyridin-Hämochrom-Differenzspektrum aufnehmen; falls notwendig, Vergleichsansatz mit wenig Kaliumferricyanid oxidieren; Reduktion durch Zusatz von wenig kristallinem Na-Dithionit

13. Chinon-Extraktion (KRÖGER, persönliche Mitteilung)

Extraktion von Menachinon aus C. formicoaceticum und C. thermoaceticum erfolgte im Prinzip nach der von KRÖGER und DADÁK (1969) beschriebenen Methode. 0,5 - 1,5 mg Partikelprotein in 0,5 ml $H_2O$ wurden mit 1 ml Aceton p.a. versetzt und gut geschüttelt. Anschließend wurden 2,5 ml Methanol (60 Vol.-%) in Petroläther (Kp. 40 - 60 °C) und 0,5 ml Petroläther hinzugefügt. Nach gründlichem Mischen wurde 15 Minuten extrahiert, nochmals geschüttelt und 2 Minuten bei 4000 Upm zentrifugiert. Die Petrolätherphase wurde vorsichtig abgehebert. Mit 1,25 ml Petroläther wurde ein zweites Mal extrahiert. Dann wurden die vereinigten Petrolätherphasen bei 30 °C im Rotationsverdampfer abgedampft. Der Rückstand wurde in 4,0 ml absolutem Äthanol aufgenommen und intensiv geschüttelt. Diese Lösung durfte kein Aceton mehr enthalten.

Zur quantitativen Bestimmung des Menachinons wurde in einer Quarzküvette (d = 1 cm) die Absorptionsabnahme bei 265 minus 289 nm auf Zusatz von 2 µl $KBH_4$ (5 mg/ml $H_2O$) und 5 µl Acetatlösung (0,1 M Acetat, pH 4,95) mit einem Perkin-Elmer-Zweistrahlphotometer gemessen. Zur Berechnung wurde der Differenz-Absorptionskoeffizient $\varepsilon_{(265 - 289\ nm)} = (\varepsilon_{red} - \varepsilon_{ox})_{265\ nm} - (\varepsilon_{red} - \varepsilon_{ox})_{289\ nm} = 14{,}7\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ verwendet (KRÖGER und DADÁK, 1969). Sollten Spektren der extrahierten Substanz aufgenommen werden, wurden die Petroläther-Extrakte von mindestens

10 Parallel-Ansätzen (je ca. 5 mg Protein) vor dem Eindampfen vereinigt. Der Rückstand wurde in 2 ml Äthanol gelöst. Absorptions- und Differenzspektren wurden im Zeiss DMR 10-Spektralphotometer (d = 1 cm) zwischen 230 und 300 nm aufgenommen. Bei Absorptionsspektren enthielt die Vergleichsküvette Äthanol. Reduktion der Probe wurde durch Zusatz von Borhydrid und Acetatlösung (siehe oben) erzielt.

Chemikalien

Für Nährlösungen, Puffer u.a. wurden Chemikalien vom höchsten handelsüblichen Reinheitsgrad verwendet. Spezielle Chemikalien und Biochemikalien hatten folgende Herkunft:
Fa. Boehringer und Söhne, Mannheim: Acetyl-CoA-Synthetase, Citrat-Synthase, DNase, Fumarase, Lactat-Dehydrogenase, Lysozym, Malat-Dehydrogenase, Myokinase, Phosphotransacetylase,Pyruvat-Kinase, Succinyl-CoA-Synthetase; Acetylphosphat, APAD, ATP, Coenzym A, GTP, NAD, $NADH_2$, NADP, $NADPH_2$, Oxalessigsäure, PEP
Fa. British Drug Houses Ltd., Poole,England: Anthron
Fa. Difco, Detroit, USA: Bacto-Agar, Hefeextrakt, Thioglykolat, Trypton
Fa. Merck, Darmstadt: DCPIP, DNP, Dithioerythrol, Na-Dithionit, Glycylglycin, Methylenblau, Pyridoxin, Riboflavin, Thiaminpyrophosphat, TTC
Fa. New England Nuclear, Boston, USA: Aquasol
Fa. The Radiochemical Center, Amersham, England: 1,4-$^{14}$C-Fumarat
Fa. Serva, Heidelberg: HEPES-Puffer, MV, p-Nitrophenylphosphat
Fa. Sigma Chemical Comp., St. Louis, USA: PMS, FMN
Die verwendeten Gase stammten von der Fa. Messer, Griesheim.

Formyl-THF-Synthetase und L-THF wurden dankenswerterweise von Herrn Prof. Dr. L.G. LJUNGDAHL zur Verfügung gestellt.
Herrn Dr. J.R. ANDREESEN danke ich für die Überlassung von auf Minimalmedien angezogenen Zellen von C. formicoaceticum.

VI. LITERATURVERZEICHNIS


ABRAMS, A.
BARON, C.
1968 Reversible attachment of adenosine triphosphatase to Streptococcal membranes and the effect of magnesium ions
Biochem. 7, 501 - 507

ADAPOE, C.
SILVER, M.
1975 The soluble adenosine triphosphatase of Thiobacillus ferrooxidans
Can. J. Microbiol. 21, 1 - 7

ALBERS, R.W.
1967 Biochemical aspects of active transport
Ann. Rev. Biochem. 36, 727 - 756

AMERINE, M.A.
KUNKEE, R.E.
1968 Microbiology of winemaking
Ann. Rev. Microbiol. 22, 323 - 358

AMONS, R.
VAN DEN BERGH, S.G.
SLATER, E.C.
1968 The effect of monovalent cations on the dinitrophenol-induced ATPase of rat-liver mitochondria
Biochim. Biophys. Acta 162, 452 - 454

ANDERSON, L.
FULLER, R.C.
1967 Photosynthesis in Rhodospirillum rubrum
III. Metabolic control of reductive pentose phosphate and tricarboxylic acid cycle enzymes
Plant Physiol. 42, 497 - 502

ANDERSON, R.L.
ORDAL, E.J.
1959 Studies on the $CO_2$-dependent fermentation of glucose by Cytophaga succinicans
Bact. Proc., S. 120

ANDREESEN, J.R.
1969 Säurebildung und Kohlenhydratabbau bei neu isolierten Stämmen von Clostridium aceticum
Diss. Göttingen

ANDREESEN, J.R.
EL GHAZZAWI, E.
GOTTSCHALK, G.
1974 The effect of ferrous ions, tungstate and selenite on the level of formate dehydrogenase in Clostridium formicoaceticum and formate synthesis from $CO_2$ during pyruvate fermentation
Arch. Microbiol. 96, 103 - 118

ANDREESEN, J.R.
GOTTSCHALK, G.
1969 The occurrence of a modified Entner-Doudoroff-pathway in Clostridium aceticum
Arch. Mikrobiol. 69, 160 - 170

ANDREESEN, J.R.
GOTTSCHALK, G.
SCHLEGEL, H.G.
1970 Clostridium formicoaceticum nov. spec. Isolation, description and distinction from C. aceticum and C. thermoaceticum
Arch. Mikrobiol. 72, 154 - 174

ANDREESEN, J.R.
LJUNGDAHL, L.G.
1973 Formate dehydrogenase of Clostridium thermoaceticum: incorporation of selenium-75, and the effects of selenite, molybdate, and tungstate on the enzyme
J. Bacteriol. 116, 867 - 873

ANDREESEN, J.R.
LJUNGDAHL, L.G.
1974 Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent formate dehydrogenase from Clostridium thermoaceticum: purification and properties
J. Bacteriol. 120, 6 - 14

ANDREESEN, J.R.
SCHAUPP, A.
NEURAUTER, C.
BROWN, A.
LJUNGDAHL, L.G.
1973 Fermentation of glucose, fructose, and xylose by Clostridium thermoaceticum: effect of metals on growth yield, enzymes, and the synthesis of acetate from $CO_2$
J. Bacteriol. 114, 743 - 751

ANDREJEW, A.
ORFANELLI, M.T.
DESBORDES, J.
1973 Métabolism du malate chez les mycobactéries
II. Répartition, séparation et propriétés de différentes malate-déshydrogénases du BCG, de Mycobacterium fortuitum et de M. phlei cultivés sur milieu synthétique de Sauton
Annales de Microbiol. 124B, 177 - 192

ANRAKU, Y.
HEPPEL, L.A.
1967 On the nature of changes induced in Escherichia coli by osmotic shock
J. Biol. Chem. 242, 2561 - 2569

ARONSON, J.N.
DOERNER, J.F.
AKERS, E.W.
BORRIS, D.P.
MANI, M.
1975 γ-Aminobutyric acid pathway of glutamate metabolism by Bacillus thuringiensis
in: Spores VI (P. Gerhardt, R.N. Costilow und H.L.Sadoff, Hrsg.), American Society for Microbiology
S. 404 - 410

ATKINSON, D.E. 1966 Regulation of enzyme activity
Ann. Rev. Biochem. 35, 85 - 124

ATKINSON, D.E. 1972 The adenylate energy charge in metabolic regulation
in: Horizons of Bioenergetics (A. San Pietro und H. Gest, Hrsg.) Academic Press, New York & London, S. 83 - 96

AUE, B.J.
DEIBEL, R.H. 1967 Fumarate reductase activity of Streptococcus faecalis
J. Bacteriol. 93, 1770 - 1776

AWAPARA, J.
SIMPSON, J.W. 1967 Comparative physiology: metabolism
Ann. Rev. Physiol. 29, 87 - 112

BARKER, H.A. 1936 On the fermentation of some dibasic $C_4$-acids by Aerobacter aerogenes
Proc. Konigl. Acad. Wetensk. Amst. 39, 674 - 683

BARKER, H.A. 1972 ATP formation by anaerobic bacteria
in: Horizons of Bioenergetics (A. San Pietro und H. Gest, Hrsg.) Academic Press, New York & London, S. 7 - 31

BARTON, L.L.
LE GALL, J.
PECK, H.D. 1970 Phosphorylation coupled to oxidation of hydrogen with fumarate in extracts of the sulfate reducing bacterium Desulfovibrio gigas
Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 1036 - 1042

BARTON, L.L.
LE GALL, J.
PECK, H.D. 1972 Oxidative phosphorylation in the obligate anaerobe, Desulfovibrio gigas
in: Horizons of Bioenergetics (A. San Pietro und H. Gest, Hrsg.) Academic Press, New York & London, S. 33 - 51

BARTON, L.L.
PECK, H.D. 1971 Phosphorylation coupled to electron transfer between lactate and fumarate in cell-free extracts of the sulfate reducing anaerobe, Desulfovibrio gigas
Bact. Proc., S. 149

BARTSCH, R.G. 1968 Bacterial cytochromes
Ann. Rev. Microbiol. 22, 181 - 200

BAUCHOP, T.
ELSDEN, S.R. 1960 The growth of microorganisms in relation to their energy supply
J. Gen. Microbiol. 23, 457 - 469

BAUM, R.H.
DOLIN, M.I.
1965 Isolation of 2-solanesyl-1,4-naphthoquinone from Streptococcus faecalis 10 C 1
J. Biol. Chem. 240, 3425 - 3433

BEIJERINCK, M.W.
FOLPMERS, T.
1916 Vorming van brandigdruivenzuur uit appelzuur door bakteriën
Proc. Konigl. Akad. Wetensk. Amst. 18, 1198 - 1200

BEISENHERZ, G.
BOLTZE, H.J.
BÜCHER, Th.
CZOK, R.
GARBADE, K.H.
MEYER-ARENDT, E.
PFLEIDERER, G.
1953 Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang
Z. Naturforschg. 8b, 555 - 577

BELAICH, J.P.
BELAICH, A.
SIMONPIETRI, P.
1972 Uncoupling in bacterial growth: effect of pantothenate starvation on growth of Zymomonas mobilis
J. Gen. Microbiol. 70, 179 - 185

BELL, G.R.
LE GALL, J.
PECK, H.D.
1974 Evidence for the periplasmic location of hydrogenase in Desulfovibrio gigas
J. Bacteriol. 120, 994 - 997

BENZIMAN, M.
LEVY, L.
1966 Phosphorylation coupled to malate oxidation in Acetobacter xylinum
Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 214 - 217

BERGMEYER, H.U.
1974 Fumarase
in: Methoden der enzymatischen Analyse, Bd.I, 3. Auflage, Verlag Chemie Weinheim/Bergstr., S. 479 - 480

BERNATH, P.
SINGER, T.P.
1962 Succinic dehydrogenase
in: Methods in Enzymology (S.P. Colowick und N.O. Kaplan, Hrsg.), Academic Press, New York, Vol.5, S. 597 - 614

BIRNBOIM, H.C.
1966 Cellular site in Bacillus subtilis of a nuclease which preferentially degrades single-stranded nucleic acids
J. Bacteriol. 91, 1004 - 1011

BISSCHOP, A.
DODDEMA, H.
KONINGS, W.N.
1975 Dicarboxylic acid transport in membrane vesicles from Bacillus subtilis
J. Bacteriol. 124, 613 - 622

BOGIN, E.
HIGASHI, T.
BRODIE, A.F.
1969 Exogenous NADH oxidation and particulate formate reductase in Mycobacterium phlei
Arch. Biochem. Biophys. 129, 211 - 220

BOOTH, I.R.
MORRIS, J.G.
1975 Proton-motive force in the obligately anaerobic bacterium Clostridium pasteurianum:a role in galactose and gluconate uptake
FEBS Letters 59, 153 - 157

BOSE, S.K.
GEST, H.
1962 Electron transport systems in purple bacteria. Hydrogenase and light-stimulated electron-transfer reactions in photosynthetic bacteria
Nature 195, 1168 - 1171

BRAGG, P.D.
HOU, C.
1967 Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide oxidation in Escherichia coli particles. 3. Cellular location of menadione reductase and ATPase activities
Can. J. Biochem. 45, 1107 - 1124

BRAGG, P.D.
HOU, C.
1968 Oxidative phosphorylation in Escherichia coli
Can. J. Biochem. 46, 631 - 641

BRAUN, V.
HANTKE, K.
1974 Bichemistry of bacterial cell envelopes
Ann. Rev. Biochem. 43, 89 - 121

BREDEMANN, G.
1909 Bacillus amylobacter A.M. et Bredemann in morphologischer, physiologischer und systematischer Beziehung. Mit besonderer Berücksichtigung des Stickstoffbindungsvermögens dieser Spezies
Zbl. Bakteriol. II 23, 385 - 568

BRODIE, A.F.
1959 Oxidative phosphorylation in fractionated bacterial systems
I. Role of soluble factors
J. Biol. Chem. 234, 398 - 404

BRYAN-JONES, D.G.
WHITTENBURY, R.
1969 Haematin-dependent phosphorylation in Streptococcus faecalis
J. Gen. Microbiol. 58, 247 - 260

BUCHANAN, B.B.
PINE, L.
1967 Path of glucose breakdown and cell yields of a facultative anaerobe, Actinomyces naeslundii
J. Gen. Microbiol. 46, 225 - 236

BURKE, K.A.
LASCELLES, J.
1975 Nitrate reductase system in Staphylococcus aureus wilde type and mutants
J. Bacteriol. 123, 308 - 316

CALDWELL, D.R.
KEENEY, M.
VAN SOEST, P.J.
1969 Effects of carbon dioxide on growth and maltose fermentation by Bacteroides amylophilus
J. Bacteriol. 98, 668 - 676

CAMPBELL, J.J.R.
BELLAMY, W.D.
GUNSALUS, I.C.
1943 Organic acids as substrate for Streptococci
J. Bacteriol. 46, 573

CAZZULO, J.J.
MASSARINI, E.
1972 Inhibition of NADP-linked malic enzyme by glyoxylate
FEBS Letters 22, 76 - 79

CHANCE, B.
1957 Techniques for the assay of the respiratory enzymes
in: Methods in Enzymology (S.P. Colowick und N.O. Kaplan, Hrsg.), Academic Press, New York & London, Vol.4 273 - 327

CHANCE, B.
WILLIAMS, G.R.
1956 The respiratory chain and oxidative phosphorylation
Adv. Enzymol. 17, 65 - 134

CHAPMAN, A.G.
FALL, L.
ATKINSON, D.E.
1971 Adenylate energy charge in Escherichia coli during growth and starvation
J. Bacteriol. 108, 1072 - 1086

CHO, K.Y.
DOY, C.H.
1973 Ultrastructure of the obligately anaerobic bacteria Clostridium kluyveri and Cl. acetobutylicum
Aust. J. Biol. Sci. 26, 547 - 558

CLARKE, D.J.
MORRIS, J.G.
1975 Action of butyricin 7423 on Clostridium pasteurianum: Changes in intracellular adenosine triphosphate concentration
Biochem. Soc. Trans. 3, 389 - 391

CLARKE, D.J.
MORRIS, J.G. 1976 Partial purification of a dicyclohexylcarbodiimide-sensitive membrane adenosine triphosphatase complex from the obligately anaerobic bacterium Clostridium pasteurianum
Biochem. J. 154, 725 - 729

CLEGG, R.A. 1975 The size of nitrate reductase in Escherichia coli
Biochem. Soc. Trans. 3, 691 - 694

COHEN, L.H.
PENNER, P.E. 1965 Regulation of Fumarase by ATP and magnesium
Fed. Proc. 24, 357

COHN, D.V. 1958 The enzymatic formation of oxalacetic acid by nonpyridine nucleotide malic dehydrogenase of Micrococcus lysodeikticus
J. Biol. Chem. 233, 299 - 304

COSTERTON, J.W.
INGRAM, J.M.
CHENG, K.-J. 1974 Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria
Bacteriol. Rev. 38, 87 - 110

COX, G.B.
GIBSON, F. 1974 Studies on electron transport and energy-linked reactions using mutants of Escherichia coli
Biochim. Biophys. Acta. 346, 1 - 25

DAVIES, D.D.
PATIL, K.D. 1974 Regulation of 'malic' enzyme of Solanum tuberosum by metabolites
Biochem. J. 137, 45 - 53

DAWES, I.W.
MANDELSTAM, J. 1970 Sporulation of Bacillus subtilis in continuous culture
J. Bacteriol. 103, 529 - 535

DECKER, K.
JUNGERMANN, K.
THAUER, R.K. 1970 Wege der Energiegewinnung in Anaerobiern
Angew. Chem. 82, 153 - 173

DEIBEL, R.H. 1964 The group D Streptococci
Bacteriol. Rev. 28, 330 - 366

DEIBEL, R.H.
KVETKAS, M.J. 1964 Fumarate reduction and its role in the diversion of glucose fermentation by Streptococcus faecalis
J. Bacteriol. 88, 858 - 864

DER VARTANIAN, D.V.
LE GALL, J. 1974 A monomolecular electron transfer chain: structure and function of cytochrome $c_3$
Biochim. Biophys. Acta 346, 79 - 99

D'EUSTACHIO, A.J. 1966 A heme-like protein from Clostridium pasteurianum
Bact. Proc., S. 71

DIESTERHAFT, M.D.
FREESE, E. 1973 Role of pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and malic enzyme during growth and sporulation of Bacillus subtilis
J. Biol. Chem. 248, 6062 - 6070

DUBLER, R.E.
TOSCANO, W.A.Jr.
HARTLINE, R.A. 1974 Transport of succinate by Pseudomonas putida
Arch. Biochem. Biophys. 160, 422 - 429

DUS, K.
DE KLERK, H.
BARTSCH, R.G.
HORIO, T.
KAMEN, M.D. 1968 On the monoheme nature of cytochrome c' (Rhodopseudomonas palustris)
Proc. Natl. Acad. Sci. 57, 367 - 370

EAGON, R.G.
ASBELL, M.A. 1966 Disruption of activity of induced permeases by tris(hydroxymethyl)aminomethane in combination with ethylenediaminetetraacetate
Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 67 - 73

EGOROV, N.S.
LORIYA, Z.K.
VLASOVA, O.S. 1972 Effect of different carbon sources on proteolytic enzyme synthesis by acetone-butyl bacteria
Microbiology USSR 41, 208 - 211

EL GHAZZAWI, E. 1967 Neuisolierung von Clostridium aceticum Wieringa und stoffwechselphysiologische Untersuchungen
Arch. Mikrobiol. 57, 1 - 19

ENOCH, H.G.
LESTER, R.L. 1974 The role of a novel cytochrome b-containing nitrate reductase and quinone in the in vitro reconstruction of formate-nitrate reductase activity of Escherichia coli
Biochem. Biophys. Res. Commun. 61, 1234 - 1241

EVANS, D.J. Jr. 1969 Membrane adenosine triphosphatase of Escherichia coli: activation by calcium ion and inhibition by monovalent cations
J. Bacteriol. 100, 914 - 922

EYZAGUIRRE, J.
CORNWELL, E.
BORIE, G.
RAMIREZ, B. 1973 Two malic enzymes in Pseudomonas aeruginosa
J. Bacteriol. 116, 215 - 221

FALK, J.E. 1964 Porphyrins and Metalloporphyrins
Elsevier Publishing Company, Amsterdam

FARRAND, S.K.
TABER, H.W. 1973 Physiological effects of menaquinone deficiency in Bacillus subtilis
J. Bacteriol. 115, 1035 - 1044

FAUST, P.J.
VANDEMARK, P.J. 1970 Phosphorylation coupled to NADH oxidation with fumarate in Streptococcus faecalis 10 C 1
Arch. Biochem. Biophys. 137, 392 - 398

FELIX, J.A.
LUNDGREN, D.G. 1973 Electron transport system associated with membranes of Bacillus cereus during vegetative growth and sporulation
J. Bacteriol. 115, 552 - 559

FONTAINE, F.E.
PETERSON, W.H.
McCOY, E.
JOHNSON, M.J.
RITTER, G.J. 1942 A new type of glucose fermentation by Clostridium thermoaceticum n.sp.
J. Bacteriol. 43, 701 - 715

FORGET, P.
PICHINOTY, F. 1964 Influence de la respiration anaérobie du nitrate et du fumarate sur le métabolisme fermentaire d'Aerobacter aerogenes
Biochim. Biophys. Acta 82, 441 - 444

FORREST, W.W.
WALKER, D.J. 1971 The generation and utilization of energy during growth
Adv. Microb. Physiol. 5, 213 - 274

FOURNIER, R.E.
McKILLEN, M.N.
PARDEE, A.B.
WILLECKE, K. 1972 Transport of dicarboxylic acids in Bacillus subtilis. Inducible uptake of L-malate
J. Biol. Chem. 247, 5587 - 5595

FRENKEL, R. 1971 Bovine heart malic enzyme
I. Isolation and partial purification of a cytoplasmic and a mitochondrial enzyme
J. Biol. Chem. 246, 3069 - 3074

FRENKEL, R. 1972 Bovine heart malic enzyme
II. Reversibility of the reaction
J. Biol. Chem. 247, 5569 - 5572

FUCK, E.
STÄRK, G.
RADLER, F. 1973 Äpfelsäurestoffwechsel bei Saccharomyces.
II. Anreicherung und Eigenschaften eines Malatenzyms
Arch. Mikrobiol. 89, 223 - 231

FULLER, R.C.
KORNBERG, H.L. 1961 A possible route for malate oxidation by Chromatium
Biochem. J. 79, 8p - 9p

FULLER, R.C.
SMILLIE, R.M.
SISLER, E.C.
KORNBERG, H.L. 1961 Carbon metabolism of Chromatium
J. Biol. Chem. 236, 2140 - 2149

GEST, H. 1952 Molecular hydrogen: oxidation and formation in cell-free systems in: Phosphorus Metabolism (W.D. McElroy und B. Glass, Hrsg.), The John Hopkins Press, Baltimore, Vol.II, S. 522 - 543

GEST, H. 1954 Oxidation and evolution of molecular hydrogen by microorganisms
Bacteriol. Rev. 18, 43 - 73

GEST, H. 1972 Energy conservation and generation of reducing power in bacterial photosynthesis
Adv. Microb. Physiol. 7, 243 - 282

GHEI, O.K.
KAY, W.W. 1973 Properties of an inducible $C_4$-dicarboxylic acid transport system in Bacillus subtilis
J. Bacteriol. 114, 65 - 79

GHOSH, B.K.
WOUTERS, J.T.M.
LAMPEN, J.O. 1971 Distribution of the sites of alkaline phosphatase(s) activity in vegetative cells of Bacillus subtilis
J. Bacteriol. 108, 928 - 937

GIBBONS, R.J.
ENGLE, R.P.
1964 Vitamin K compounds in bacteria that are obligate anaerobes
Science 146, 1307 - 1309

GIBSON, J.
1975 Uptake of $C_4$ dicarboxylates and pyruvate by Rhodopseudomonas spheroides
J. Bacteriol. 123, 471 - 480

GILLES, R.
1970 Intermediary metabolism and energy production in some invertebrates
Arch. Intern. Physiol. Biochim. 78, 313 - 326

GOLDSCHMIDT, M.C.
GOLDSCHMIDT, E.P.
WYSS, O.
1967 Differences in toxicity of EDTA + tris among mating types of Escherichia coli
Can. J. Microbiol. 13, 1401 - 1407

GOOD, N.E.
WINGET, G.D.
WINTER, W.
CONNOLLY, T.N.
IZAWA, S.
SINGH, R.M.M.
1966 Hydrogen ion buffers for biological research
Biochemistry 5, 467 - 477

GOTTWALD, M.
1973 Untersuchungen zum Pentosestoffwechsel bei Homoacetatgärern
Diplomarbeit, Göttingen

GOTTWALD, M.
ANDREESEN, J.R.
LE GALL, J.
LJUNGDAHL, L.G.
1975 Presence of cytochrome and menaquinone in Clostridium formicoaceticum and Clostridium thermoaceticum
J. Bacteriol. 122, 325 - 328

GRELET, N.
1957 Growth limitation and sporulation
J. Appl. Bacteriol. 20, 315 - 324

GROSS, R.
COLES, N. W.
1968 Adenosine triphosphatase in isolated membranes of Staphylococcus aureus
J. Bacteriol. 95, 1322 - 1326

GROSSMAN, J.P.
POSTGATE, J.R.
1955 The metabolism of malate and certain other compounds by Desulphovibrio desulphuricans
J. Gen. Microbiol. 12, 429 - 445

GUARRAIA, L.J.
PECK, H.D.
1971 Dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase activity in extracts of Desulfovibrio gigas
J. Bacteriol. 106, 890 - 895

GUTOWSKI, S.J.
ROSENBERG, H.
1976 Energy coupling to active transport in anaerobically grown mutants of Escherichia coli K 12
Biochem. J. 154, 731 - 734

HAAS, D.W.
1964 Phosphorylation coupled to the oxidation of NADH by fumarate in digitonin fragments of beef-heart mitochondria
Biochim. Biophys. Acta 92, 433 - 439

HADDOCK, B.A.
KENDALL-TOBIAS, M.W.
1975 Functional anaerobic electron transport linked to the reduction of nitrate and fumarate in membranes from Escherichia coli as demonstrated by quenching of atebrin fluorescence
Biochem. J. 152, 655 - 659

HADJIPETROU, L.P.
GERRITS, J.P.
TEULINGS, F.A.G.
STOUTHAMER, A.H.
1964 Relation between energy production and growth of Aerobacter aerogenes
J. Gen. Microbiol. 36, 139 - 150

HAFKENSCHEID, J.C.M.
BONTING, S.L.
1969 Studies on $(Na^+ + K^+)$-activated ATPase XXIII. A $Mg^{2+}$-ATPase in Escherichia coli, activated by monovalent cations
Biochim. Biophys. Acta 178, 128 - 136

HAGIHARA, B.
OSHINO, R.
JIZUKA, T.
1974 Studies on low temperature spectra of respiratory pigments
II. Spectra of cytochromes in respiratory systems between liquid helium and room temperatures
J. Biochem. 75, 45 - 51

HANSEN, E.J.
JUNI, E.
1974 Two routes for synthesis of phosphoenolpyruvate from $C_4$-dicarboxylic acids in Escherichia coli
Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 1204 - 1210

HANSEN, E.J.
JUNI, E.
1975 Isolation of mutants of Escherichia coli lacking NAD- and NADP-linked malic enzyme activities
Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 559 - 566

HANSON, R.S.
MacKECHNIE, I.
1969 Regulation of sporulation and the entry of carbon into the tricarboxylic acid cycle
in: Spores IV (L.L. Campbell, Hrsg.)
American Society for Microbiology
S. 196 - 211

HAROLD, F.M.
BAARDA, J.R.
PAVLASOVA, E.
1970 Extrusion of sodium and hydrogen ions as the primary process in potassium ion accumulation by Streptococcus faecalis
J. Bacteriol. 101, 152 - 159

HATCH, M.D.
KAGAWA, T.
1974 NAD malic enzyme in leaves with $C_4$-pathway photosynthesis and its role in $C_4$-acid decarboxylation
Arch. Biochem. Biophys. 160, 346 - 349

HATCHIKIAN, E.C.
1974 On the role of menaquinone-6 in the electron transport of hydrogen: fumarate reductase system in the strict anaerobe Desulfovibrio gigas
J. Gen. Microbiol. 81, 261 - 266

HATCHIKIAN, E.C.
LE GALL, J.
1970a Etude du métabolisme des acides dicarboxyliques et du pyruvate chez les bactéries sulfato-réductrices
I. Etude de l'oxydation enzymatique du fumarate en acétate
Ann. Inst. Pasteur 118, 125 - 142

HATCHIKIAN, E.C.
LE GALL, J.
1970b Etude du métabolisme des acides dicarboxyliques et du pyruvate chez les bactéries sulfato-réductrices
II. Transport des électrons; accepteurs finaux
Ann. Inst. Pasteur 118, 288 - 301

HATCHIKIAN, E.C.
LE GALL, J.
1972 Evidence for the presence of a b-type cytochrome in the sulfate-reducing bacterium Desulfovibrio gigas, and its role in the reduction of fumarate by molecular hydrogen
Biochim. Biophys. Acta 267, 479 - 484

HAUBER, J.
SINGER, T.P.
1967 Studies on succinic dehydrogenase
14. Intracellular distribution, catalytic properties and regulation of fumarate reductases in yeast
Eur. J. Biochem. 3, 107 - 116

HEPPEL, L.A.
1967 Selective release of enzymes from bacteria
Science 156, 1451 - 1455

HEPPEL, L.A.
1971 The concept of periplasmic enzymes
in: Structure and Function of Biological Membranes (L.I. Rothfield, Hrsg.)
Academic Press, New York & London,
S. 223 - 247

HEPPEL, L.A.
HARKNESS, D.R.
HILMOE, R.J.
1962 A study of the substrate specificity and other properties of the alkaline phosphatase of Escherichia coli
J. Biol. Chem. 237, 841 - 846

HIGA, A.J.
MILRAD de FORCHETTI, S.R.
CAZZULO, J.J.
1976 $CO_2$-fixing enzymes in Pseudomonas fluorescens
J. Gen. Microbiol. 93, 69 - 74

HILL, R.L.
BRADSHAW, R.A.
1969 Fumarase
in: Methods in Enzymology (S.P. Colowick und N.O. Kaplan, Hrsg.), Academic Press, New York & London, Vol.XIII, S. 91 - 99

HIRSCH, C.A.
RAMINSKY, M.
DAVIS, B.D.
LIN, E.C.C.
1963 A fumarate reductase in Escherichia coli distinct from succinate dehydrogenase
J. Biol. Chem. 238, 3770 - 3774

HOBBS, A.S.
DE WEER, P.
1976 Transport adenosine triphosphatase: Absence of ATP : p-nitrophenol phosphotransferase activity
Arch. Biochem. Biophys. 173, 386 - 388

HOBSON, P.N.
SUMMERS, R.
1967 The continuous culture of anaerobic bacteria
J. Gen. Microbiol. 47, 53 - 65

HOBSON, P.N.
SUMMERS, R.
1972 ATP pool and growth yield in Selenomonas ruminantium
J. Gen. Microbiol. 70, 351 - 360

HOPPER, D.J.
CHAPMAN, P.J.
DAGLEY, S.
1970 Metabolism of L-malate and D-malate by a species of Pseudomonas
J. Bacteriol. 104, 1197 - 1202

HORIO, T.
NISHIKAWA, K.
KATSUMATA, M.
YAMASHITA, J.
1965 Possible partial reactions of the photophosphorylation process in chromatophores from Rhodospirillum rubrum
Biochim. Biophys. Acta 94, 371 - 382

HORIUTI, Y.
NISHIKAWA, K.
HORIO, T.
1968 Oxidation-reduction potential-dependent adenosine triphosphatase activity of chromatophores from Rhodospirillum rubrum
J. Biochem. 64, 577 - 587

HSU, R.Y.
LARDY, H.A. 1969 Malic enzyme
in: Methods in Enzymology (S.P. Colowick und N.O. Kaplan, Hrsg.), Academic Press, New York & London, Vol.XIII, S. 230 - 235

HSU, E.J.
ORDAL, Z.J. 1969 Sporulation of Clostridium thermosaccharolyticum under conditions of restricted growth
J. Bacteriol. 97, 1511 - 1512

v.HUGO, H. 1973 Der Einfluß von Wasserstoff auf die Pyruvatvergärung und die physiologische Bedeutung der 1-Phosphofructokinase bei saccharolytischen Clostridien
Diss. Göttingen

IMAI, Y.
IMAI, K.
SATO, R.
HORIO, T. 1969 Three spectrally different states of cytochromes cc' and c' and their interconversion
J. Biochem. 65, 225 - 237

IMSENECKI, A. 1934 Struktur und Entwicklungsgeschichte des Granulobacter pectinovorum (Fribes)
Arch. Mikrobiol. 5, 451 - 476

JACOBS, N.J.
JACOBS, J.M. 1975 Fumarate as alternate electron acceptor for the late steps of anaerobic heme synthesis in Escherichia coli
Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 435 - 441

JACOBS, N.J.
WOLIN, M.J. 1963a Electron-transport system of Vibrio succinogenes
I. Enzymes and cytochromes of the electron-transport system
Biochim. Biophys. Acta 69, 18 - 28

JACOBS, N.J.
WOLIN, M.J. 1963b Electron-transport system of Vibrio succinogenes
II. Inhibition of electron-transport by 2-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide
Biochim. Biophys. Acta 69, 29 - 39

JACOBSEN, L.A.
BARTHOLOMAUS, R.C.
GUNSALUS, I.C. 1966 Repression of malic enzyme by acetate in Pseudomonas
Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 955 - 960

JANGAARD, N.O.
UNKELESS, J.
ATKINSON, D.E.
1968 The inhibition of citrate synthase by ATP
Biochim. Biophys. Acta 151, 225 - 235

JONES, H.E.
1971 A re-examination of Desulfovibrio africanus
Arch. Mikrobiol. 80, 78 - 86

JOYNER, A.E. Jr.
BALDWIN, R.L.
1966 Enzymatic studies of pure cultures of rumen microorganisms
J. Bacteriol. 92, 1321 - 1330

JURTSHUK, P. Jr.
MUELLER, T.J.
ACORD, W.C.
1975 Bacterial terminal oxidases
CRC Critical Reviews in Microbiol. 3, 399 - 468

KANAREK, L.
MARLER, E.
BRADSHAW, R.A.
FELLOWS, R.E.
HILL, R.L.
1964 The subunits of fumarase
J. Biol. Chem. 239, 4207 - 4211

KANDLER, O.
WINTER, J.
STETTER, K.O.
1973 Zur Frage der Beeinflussung der Glucosevergärung durch L-Malat bei Leuconostoc mesenteroides
Arch. Mikrobiol. 90, 65 - 75

KATSUKI, H.
TAKEO, K.
KAMEDA, K.
TANAKA, S.
1967 Existence of two malic enzymes in Escherichia coli
Biochem. Biophys. Res. Commun. 27, 331 - 336

KAY, W.W.
KORNBERG, H.L.
1971 The uptake of $C_4$-dicarboxylic acids by Escherichia coli
Eur. J. Biochem. 18, 274 - 281

KENNEDY, I.R.
RIGAUD, J.
TRINCHANT, J.C.
1975 Nitrate reductase from bacteroids of Rhizobium japonicum: enzyme characteristics and possible interaction with nitrogen fixation
Biochim. Biophys. Acta 397, 24 - 35

KISTLER, W.S.
LIN, E.C.C.
1972 Purification and properties of the flavine-stimulated anaerobic L-α-glycerophosphate dehydrogenase of Escherichia coli
J. Bacteriol. 112, 539 - 547

KLEBER, H.-P. 1975a Inhibition of the malic enzyme from Acinetobacter calcoaceticus by acetyl-CoA
Zeitschr. f. Allgem. Mikrobiol. 15, 19 - 23

KLEBER, H.-P. 1975b Inhibition of NADP-linked malic enzyme by ATP in Acinetobacter
FEBS Letters 51, 274 - 276

DE KLERK, H.
BARTSCH, R.G.
KAMEN, M.D. 1965 Atypical soluble haem proteins from a strain of Rhodopseudomonas palustris sp.
Biochim. Biophys. Acta 97, 275 - 280

KMETEC, E.
BUEDING, E. 1961 Succinic and reduced diphosphopyridine nucleotide oxidase systems of Ascaris muscle
J. Biol. Chem. 236, 584 - 591

KOEPSELL, H.J.
JOHNSON, M.J. 1942 Dissimilation of pyruvic acid by cell-free preparations of Clostridium butylicum
J. Biol. Chem. 145, 379 - 386

KONINGS, W.N.
KABACK, H.R. 1973 Anaerobic transport in Escherichia coli membrane vesicles
Proc. Natl. Acad. Sci. 70, 3376 - 3381

KORNBERG, H.L. 1966 Anaplerotic sequences and their role in metabolism
in: Essays in Biochemistry (P.N. Campbell und G.D. Greville, Hrsg.), Academic Press, New York & London, Vol.2, S. 1 - 31

KOVAC, L. 1958 Untersuchung der Succinodehydrogenase II. Darstellung und Eigenschaften der pflanzlichen Succinodehydrogenase
Collection Czechoslov. Chem. Commun. 23, 1140 - 1152

KREBS, H.A. 1937 The role of fumarate in the respiration of Bacterium coli commune
Biochem. J. 31, 2095 - 2124

KRÖGER, A. 1974 Electron-transport phosphorylation coupled to fumarate reduction in anaerobically grown Proteus rettgeri
Biochim. Biophys. Acta 347, 273 - 289

KRÖGER, A.
DADAK, V.
1969 On the role of quinones in bacterial electron transport. The respiratory system of Bacillus megaterium
Eur. J. Biochem. 11, 328 - 340

KRÖGER, A.
DADAK, V.
KLINGENBERG, M.
DIEMER, F.
1971 On the role of quinones in bacterial electron transport; differential roles of ubiquinone and menaquinone in Proteus rettgeri
Eur. J. Biochem. 21, 322 - 333

LASCELLES, J.
1968 Regulation of haem and chlorophyll synthesis
in: Porphyrins and related compounds (T.W. Goodwin, Hrsg.), Academic Press London & New York, S. 49 - 59

LASCELLES, J.
STILL, J.L.
1947 The utilization of fumarate and malate by Escherichia coli in the presence of molecular hydrogen
Proc. Linnean Soc. N.S.W. 72, 49 - 57

LASTRAS, M.
MUNOZ, E.
1974 Membrane adenosine triphosphatase of Micrococcus lysodeikticus: effect of millimolar $Mg^{2+}$ in modulating the properties of the membrane-bound enzyme
J. Bacteriol. 119, 593 - 601

LE GALL, J.
MAZZA, G.
DRAGONI, N.
1965 Le cytochrome $c_3$ de Desulfovibrio gigas
Biochim. Biophys. Acta 99, 385 - 387

LEMBERG, R.
BARRETT, J.
1973 Cytochromes
Academic Press, London & New York,

LENTZ, K.
WOOD, H.G.
1955 Synthesis of acetate from formate and carbon dioxide by Clostridium thermoaceticum
J. Biol. Chem. 215, 645 - 654

LIEBERMAN, M.A.
HONG, J.-S.
1974 A mutant of Escherichia coli defective in the coupling of metabolic energy to active transport
Proc. Natl. Acad. Sci. 71, 4395 - 4399

LIN, R.C.
DAVIES, E.J. 1974 Malic enzymes of rabbit heart mitochondria. Separation and comparison of some characteristics of a nicotinamide adenine dinucleotide-preferring and a nicotinamide adenine dinucleotide phosphate specific enzyme
J. Biol. Chem. 249, 3867 - 3875

LINKE, H.A.B. 1967 Über den Abbau von Fructose durch Clostridium aceticum
Diss. Göttingen

LINKE, H.A.B. 1969a Der Fructose-Stoffwechsel von Clostridium aceticum
Zbl. Bakt. II 123, 369 - 379

LINKE, H.A.B. 1969b $CO_2$-Fixierung durch Clostridium aceticum: $^{14}CO_2$-Kurzzeiteinbau und Pyruvatstoffwechsel
Arch. Mikrobiol. 64, 203 - 214

LJUNGDAHL, L.G.
ANDREESEN, J.R. 1975 Tungsten, a component of active formate dehydrogenase from Clostridium thermoaceticum
FEBS Letters 54, 279 - 282

LJUNGDAHL, L.G.
ANDREESEN, J.R. 1976 Reduction of $CO_2$ to acetate in homoacetate fermenting Clostridia and the involvement of tungsten in formate dehydrogenase
in: Symposium on Microbial Production and Utilization of Gases ($H_2$,$CH_4$, CO) (H.G. Schlegel, G. Gottschalk, N. Pfennig, Hrsg.), Verlag Goltze KG, Göttingen, im Druck

LJUNGDAHL, L.G.
WOOD, H.G. 1969 Total synthesis of acetate from $CO_2$ by heterotrophic bacteria
Ann. Rev. Microbiol. 23, 515 - 538

LO, T.C.Y.
RAYMAN, M.K.
SANWAL, B.D. 1972 Transport of succinate in Escherichia coli. I. Biochemical and genetic studies of transport in whole cells
J. Biol. Chem. 247, 6323 - 6331

LO, T.C.Y.
RAYMAN, M.K.
SANWAL, B.D. 1974 Transport of succinate in Escherichia coli. III. Biochemical and genetic studies on the mechanism of transport in membrane vesicles
Can. J. Biochem. 52, 854 - 866

LO, T.C.Y.
SANWAL, B.D. 1975 Membrane bound substrate recognition components of the dicarboxylate transport system in Escherichia coli
Biochem. Biophys. Res. Commun. 63, 278 - 285

LONDON, J.
MEYER, E.Y. 1969a Malate utilization by a group D Streptococcus. Physiological properties and purification of an inducible malic enzyme
J. Bacteriol. 98, 705 - 711

LONDON, J.
MEYER, E.Y. 1969b Malate utilization by a group D Streptococcus. II. Evidence for allosteric inhibition of an inducible malate dehydrogenase (decarboxylating) by ATP and glycolytic intermediate products
Biochim. Biophys. Acta 178, 205 - 212

LONDON, J.
MEYER, E.Y. 1970 Malate utilization by a group D Streptococcus: Regulation of malic enzyme synthesis by an inducible malate permease
J. Bacteriol. 102, 130 - 137

LONDON, J.
MEYER, E.Y.
KULCZYK, S.R. 1970 Allosteric control of a Lactobacillus malate dehydrogenase (decarboxylating) by two glycolytic intermediate products
Biochim. Biophys. Acta 212, 512 - 514

LONDON, J.
MEYER, E.Y.
KULCZYK, S.R. 1971 Comparative biochemical and immunological study of malic enzyme from two species of lactic acid bacteria: Evolutionary implications
J. Bacteriol. 106, 126 - 137

MACRAE, A.R. 1971 Isolation and properties of a malic enzyme from cauliflower bud mitochondria
Biochem. J. 122, 495 - 501

MACY, J.
KULLA, H.
GOTTSCHALK, G. 1976 $H_2$-dependent anaerobic growth of Escherichia coli on L-malate: succinate formation
J. Bacteriol. 125, 423 - 428

MACY, J.
PROBST, I.
GOTTSCHALK,G
1975 Evidence for cytochrome involvement in fumarate reduction and adenosine-5'-triphosphate synthesis by Bacteroides fragilis grown in the presence of hemin
J. Bacteriol. 123, 436 - 442

MALAMY, M.
HORECKER, B.L.
1961 The localization of alkaline phosphatase in Escherichia coli K 12
Biochem. Biophys. Res. Commun. 5, 104 - 108

MALONEY, P.C.
WILSON, T.H.
1976 ATP synthesis driven by a protonmotive force in Streptococcus lactis
J. Membrane Biol. 25, 285 - 310

MARKHAM, R.
1942 A steam destillation apparatus suitable for microkjeldahl analysis
Biochem. J. 36, 790 - 791

MAROC, J.
AZERAD, R.
KAMEN, M.D.
LE GALL, J.
197C Menaquinone (MK-6) in the sulfate-reducing obligate anaerobe, Desulfovibrio
Biochim. Biophys. Acta 197, 87 - 89

MASSEY, V.
SINGER, T.P.
1957 Studies on succinic dehydrogenase III. The fumaric reductase activity of succinic dehydrogenase
J. Biol. Chem. 228, 263 - 274

MATIN, A.
KONINGS, W.N.
1972 Transport of lactate and succinate by membrane vesicles of Escherichia coli, Bacillus subtilis and a Pseudomonas species
Eur. J. Biochem. 34, 58 - 67

MATULA, T.I.
McDONALD, I.J.
MARTIN, S.M.
1969 $CO_2$ fixation by malic enzyme in a species of Micrococcus
Biochem. Biophys. Res. Commun. 34, 795 - 802

MAUCK, J.
GLASER, L.
1970 Periplasmic nucleoside diphosphate sugar hydrolase from Bacillus subtilis
Biochemistry 9, 1140 - 1147

McCULLOUGH, W.
ROBERTS, C.F.
1974 The role of malic enzyme in Aspergillus nidulans
FEBS Letters 41, 238 - 242

MERCER, W.A.
VAUGHN, R.H. 1951 The characteristics of some thermophilic, tartrate-fermenting anaerobes
J. Bacteriol. 62, 27 - 37

MIKI, K.
LIN, E.C.C. 1973 Enzyme complex which couples glycerol-3-phosphate dehydrogenation to fumarate reduction in Escherichia coli
J. Bacteriol. 114, 767 - 771

MIKI, K.
LIN, E.C.C. 1975 Anaerobic energy-yielding reaction associated with transhydrogenation from glycerol-3-phosphate to fumarate by an Escherichia coli system
J. Bacteriol. 124, 1282 - 1287

MILLER, J.D.A.
NEUMANN, P.M.
ELFORD, L.
WAKERLEY, D.S. 1970 Malate dismutation by Desulfovibrio
Arch. Mikrobiol. 71, 214 - 219

MILLER, J.D.A.
WAKERLEY, D.S. 1966 Growth of sulfate-reducing bacteria by fumarate dismutation
J. Gen. Microbiol. 43, 101 - 107

MOMOSE, H.
NISHIKAWA, H.
KATSUYA, N. 1964 Genetic and biochemical studies on 5'-nucleotide fermentation
J. Gen. Appl. Microbiol. 10, 343 - 358

MORTENSON, L.E.
VALENTINE, R.C.
CARNAHAN, J.E. 1963 Ferredoxin in the phosphoroclastic reaction of pyruvic acid and its relation to nitrogen fixation in Clostridium pasteurianum
J. Biol. Chem. 238, 794 - 800

MORTON, R.K.
SHEPLEY, K. 1965 The formation and properties of a cytochrome c-type haemoprotein (cytochrome $b_2$ -haemoprotein-550) from cytochrome $b_2$
Biochim. Biophys. Acta 96, 349 - 356

MUNOZ, E.
NACHBAR, M.S.
SCHOR, M.T.
SALTON, M.R.J. 1968 Adenosine triphosphatase of Micrococcus lysodeikticus: selective release and relationship to membrane structure
Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 539 - 546

MURAI, T.
TOKUSHIGE, M.
NAGAI, J.
KATSUKI, H. 1972 Studies on regulatory functions of malic enzyme. 1. Metabolic functions of NAD- and NADP-linked malic enzymes in Escherichia coli
J. Biochem. 71, 1015 - 1028

MURAKAWA, S.
IZAKI, K.
TAKAHASHI, H.
1973 A transport system for $C_4$-dicarboxylic acids in isolated membrane preparations from Escherichia coli
Agric. Biol. Chem. 37, 1905 - 1914

NEU, H.C.
HEPPEL, L.A.
1965 The release of enzymes from Escherichia coli by osmotic shock and during the formation of spheroplasts
J. Biol. Chem. 240, 3685 - 3692

NEWTON, N.
1969 The two-haem nitrite reductase of Micrococcus denitrificans
Biochim. Biophys. Acta 185, 316 - 331

NEWTON, N.A.
COX, G.B.
GIBSON, F.
1971 The function of menaquinone (vitamin $K_2$) in Escherichia coli K-12
Biochim. Biophys. Acta 244, 155 - 166

NOSSAL, N.G.
HEPPEL, L.A.
1966 The release of enzymes by osmotic shock from Escherichia coli in exponential phase
J. Biol. Chem. 241, 3055 - 3062

O'BRIEN, W.E.
LJUNGDAHL, L.G.
1972 Fermentation of fructose and synthesis of acetate from carbon dioxide by Clostridium formicoaceticum
J. Bacteriol. 109, 626 - 632

OCHOA, S.
1955 Malic enzyme
in: Methods in Enzymology (S.P. Colowick und N.O. Kaplan, Hrsg.), Academic Press, New York & London, Vol.I, S. 739 - 753

OCHOA, S.
MEHLER, A.H.
KORNBERG, A.
1948 Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation
I. Isolation and properties of an enzyme from pigeon liver catalyzing the reversible oxidative decarboxylation of L-malic acid
J. Biol. Chem. 174, 979 - 1000

OHNE, M.
1975 Regulation of the dicarboxylic acid part of the citric acid cycle in Bacillus subtilis
J. Bacteriol. 122, 224 - 234

OHNE, M.
RUTBERG, B.
1976 Repression of sporulation in Bacillus subtilis by L-malate
J. Bacteriol. 125, 453 - 460

OMELIANSKI, W. 1905-1914 Der Abbau einiger organischer Säuren durch Spaltpilze
§ 137: Organische Säuren als Kohlenstoff-Quelle für Mikroorganismen
in: Handbuch der technischen Mykologie (F. Lafar, Hrsg.), Gustav Fischer Verlag, Jena, V. Band, 2. Aufl.
S. 633 - 654

OWEN, T.G.
HOCHACHKA, P.W. 1974 Purification and properties of dolphin muscle aspartate and alanine transaminases and their possible roles in the energy metabolism of diving mammals
Biochem. J. 143, 541 - 553

PAPA, S.
CHEAH, K.S.
RASMUSSEN, H.N.
LEE, I.Y.
CHANCE, B. 1970 Mechanism of malate utilization in Ascaris-muscle mitochondria
Eur. J. Biochem. 12, 540 - 543

PARK, L.S.
GUTTMAN, H.N. 1973 Purification and properties of Lactobacillus plantarum inducible malic enzyme
J. Bacteriol. 116, 263 - 270

PARVIN, R.
PANDE, S.V.
VENKITASUBRAMANIAN, T.A. 1964 Purification and properties of malate dehydrogenase (decarboxylating) from Mycobacterium 607
Biochim. Biophys. Acta 92, 260 - 277

PAYNE, W.J. 1970 Energy yield and growth of heterotrophs
Ann. Rev. Microbiol. 24, 17 - 52

PECK, H.D. Jr. 1966 Phosphorylation coupled with electron transfer in extracts of the sulfate reducing bacterium Desulfovibrio gigas
Biochem. Biophys. Res. Commun. 22, 112 - 118

PECK, H.D. Jr.
GEST, H. 1954 Fumarate reduction by molecular hydrogen in cell-free systems
Bact. Proc., S. 112

PECK, H.D.
SMITH, H.O.
GEST, H. 1957 Comparative biochemistry of the biolocical reduction of fumaric acid
Biochim. Biophys. Acta 25, 142 - 147

PFENNIG, N. 1967 Photosynthetic bacteria
Ann. Rev. Microbiol. 21, 285 - 324

PFENNIG, N.
LIPPERT, K.D. 1966 Über das Vitamin $B_{12}$-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien
Arch. Mikrobiol. 55, 245 - 256

PICHINOTY, F.
LeMINOR, L.
MOLLARET, H.H. 1965 Recherche de la fumarate-réductase chez les bactéries anaérobies facultatives
Can. J. Microbiol. 11, 287 - 290

PINSENT, J. 1954 The need of selenite and molybdate in the formation of formic dehydrogenase by members of the coli-aerogenes group of bacteria
Biochem. J. 57, 10 - 16

POSTGATE, J.R. 1956 Cytochromes $c_3$ and desulphoviridin; pigments of the anaerobe Desulphovibrio desulfuricans
J. Gen. Microbiol. 14, 545 - 572

PULLMAN, M.E.
PENEFSKY, H.S.
DATTA, A.
RACKER, E. 1960 Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation
I. Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase
J. Biol. Chem. 235, 3322 - 3329

PULLMAN, M.E.
SCHATZ, G. 1967 Mitochondrial oxidations and energy coupling
Ann. Rev. Biochem. 36, 539 - 610

QADRI, S.M.H.
HOARE, D.S. 1968 Formic hydrogenlyase and the photoassimilation of formate by a strain of Rhodopseudomonas palustris
J. Bacteriol. 95, 2344 - 2357

QUASTEL, J.H. 1924 On the fermentation of the unsaturated dicarboxylic acids
I. Fumaric acid
Biochem. J. 18, 365 - 380

QUASTEL, J.H.
STEPHENSON, M. 1925 Further observations on the anaerobic growth of bacteria
Biochem. J. 19, 660 - 666

QUASTEL, J.H.
STEPHENSON, M.
WHETHAM, M.D. 1925 Some reactions of resting bacteria in relation to anaerobic growth
Biochem. J. 19, 304 - 317

QUASTEL, J.H.
WOOLDRIDGE, W.R. 1929 Reduction potential, energy exchange and cell growth. Experiments with Bacterium coli
Biochem. J. 23, 115 - 137

RABINOWITZ, J.C.
PRICER, W.E. Jr. 1957 An enzymatic method for the determination of formic acid
J. Biol. Chem. 229, 321 - 328

RACKER, E. 1950 Spectrophotometric measurements of enzymatic formation of fumaric and cis-aconitic acids
Biochim. Biophys. Acta 4, 211 - 214

RADLER, F.
SCHÜTZ, M.
DOELLE, H.W. 1970 Die beim Abbau von L-Äpfelsäure durch Milchsäurebakterien entstehenden Isomeren der Milchsäure
Naturwissenschaften 57, 672

RAE, A.S.
STRICKLAND, K.P. 1975 Uncoupler and anaerobic resistant transport
Biochem. Biophys. Res. Commun. 62, 568 - 576

RAUEN, H.M. 1964 Fumarase
in: Biochemisches Taschenbuch, Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York, 2. Aufl. 2.Teil S. 710

RAYMAN, M.K.
LO, T.C.Y.
SANWAL, B.D. 1972 Transport of succinate in Escherichia coli II. Characteristics of uptake and energy coupling with transport in membrane preparations
J. Biol. Chem. 247, 6332 - 6339

REW, R.S.
SAZ, H.J. 1974 Enzyme localization in the anaerobic mitochondria of Ascaris lumbricoides
J. Cell Biol. 63, 125 - 135

RIEBELING, V.
THAUER, R.K.
JUNGERMANN, K. 1975 The internal-alkaline pH gradient, sensitive to uncoupler and ATPase inhibitor, in growing Clostridium pasteurianum
Eur. J. Biochem. 55, 445 - 453

RITCHEY, T.W.
SEELEY, H.W. Jr. 1974 Cytochromes in Streptococcus faecalis var. zymogenes grown in a haematin-containing medium
J. Gen. Microbiol. 85, 220 - 228

RIZZA, V.
SINCLAIR, P.R.
WHITE, D.C.
CUORANT, P.R.
1968 Electron transport system of the protoheme-requiring anaerobe Bacteroides melaninogenicus
J. Bacteriol. 96, 665 - 671

RUIZ-HERRERA, J.
ALVAREZ, A.
1972 A physiological study of formate dehydrogenase, formate oxidase and hydrogenlyase in Escherichia coli
Ant. v. Leeuwenhoek 38, 479 - 491

SALTON, M.R.J.
1960 Surface layers of the bacterial cell
in: The Bacteria (I.C. Gunsalus und R.Y. Stanier, Hrsg.), Academic Press, New York & London, Vol.1, S. 97 - 151

SALTON, M.R.J.
1967 Structure and function of bacterial cell membranes
Ann. Rev. Microbiol. 21, 417 - 442

SANADI, D.R.
FLUHARTY, A.L.
1963 On the mechanism of oxidative phosphorylation . VII. The energy-requiring reduction of pyridine nucleotide by succinate and the energy-yielding oxidation of reduced pyridine nucleotide by fumarate
Biochemistry 2, 523 - 528

SANWAL, B.D.
1970 Regulatory characteristics of the diphosphopyridine nucleotide-specific malic enzyme of Escherichia coli
J. Biol. Chem. 245, 1212 - 1216

SANWAL, B.D.
SMANDO, R.
1969 Malic enzyme of Escherichia coli. Diversity of the effectors controlling enzyme activity
J. Biol. Chem. 244, 1817 - 1823

SAZ, H.J.
HUBBARD, J.A.
1957 The oxidative decarboxylation of malate by Ascaris lumbricoides
J. Biol. Chem. 225, 921 - 933

SCHAUPP, A.
LJUNGDAHL, L.G.
1974 Purification and properties of acetate kinase from Clostridium thermoaceticum
Arch. Microbiol. 100, 121 - 129

SCHNEIDER, K.
1975 Reinigung und Charakterisierung der löslichen Hydrogenase von Alcaligenes eutrophus H 16
Diss. Göttingen

SCHOBERTH, S. 1970 Untersuchungen über die Äthanol-Acetat-Gärung von Clostridium kluyveri
Diss. Göttingen

SCHOBERTH, S.
BALCH, W.E. 1975 A new hydrogen-oxidizing acetate-forming anaerobe
Abstr. Ann. Meeting Am. Soc. Microbiol., S. 131

SCHULMAN, M.
PARKER, D.
LJUNGDAHL, L.G.
WOOD, H.G. 1972 Total synthesis of acetate from $CO_2$ V. Determination by mass analysis of the different types of acetate formed from $^{13}CO_2$ by heterotrophic bacteria
J. Bacteriol. 109, 633 - 644

SCHÜTZ, M.
RADLER, F. 1973 Das "Malatenzym" von Lactobacillus plantarum und Leuconostoc mesenteroides
Arch. Mikrobiol. 91, 183 - 202

SCHÜTZ, M.
RADLER, F. 1974 Das Vorkommen von Malatenzym und Malo-Lactat-Enzym bei verschiedenen Milchsäurebakterien
Arch. Microbiol. 96, 329 - 339

SCHWARTZ, A.C. 1973 Terpenoid quinones of the anaerobic Propionibacterium shermanii. I. (II, III)-tetrahydromenaquinone-9
Arch. Mikrobiol. 91, 273 - 279

SCHWARTZ, A.
LINDENMAYER, G.E.
ALLEN, J.C. 1972 The $Na^+,K^+$-ATPase membrane transport system: importance in cellular function
in: Current Topics in Membranes and Transport (F. Bronner und A. Kleinzeller, Hrsg.), Academic Press, New York & London, Vol.3, S. 1 - 82

SCHWARTZ, A.C.
SPORKENBACH, J. 1975 The electron transport system of the anaerobic Propionibacterium shermanii. Cytochrome and inhibitor studies
Arch. Microbiol. 102, 261 - 273

SEIDMAN, J.
ENTNER, N. 1961 Oxidative enzymes and their role in phosphorylation in sarcosomes of adult Ascaris lumbricoides
J. Biol. Chem. 236, 915 - 919

SIEBERT, D. 1969 Über propanverwertende, wasserstoffoxidierende Bakterien und die Charakterisierung eines Förderungsfaktors
Diss. Göttingen

SINCLAIR, P.R.
WHITE, D.C. 1970 Effect of nitrate, fumarate and oxygen on the formation of the membrane-bound electron transport system of Haemophilus parainfluenzae
J. Bacteriol. 101, 365 - 372

SINGER, T.P.
HAUBER, J. 1965 The fumarate reductases of yeast
Fed. Proc. 24, 297

SINGER, T.P.
KEARNEY, E.B.
KENNEY, W.C. 1973 Succinate dehydrogenase
Adv. Enzymol. 37, 189 - 272

SINGH, A.P.
BRAGG, P.D. 1975 Reduced nicotinamide adenine dinucleotide dependent reduction of fumarate coupled to membrane energization in a cytochrome deficient mutant of Escherichia coli K 12
Biochim. Biophys. Acta 396, 229 - 241

SINGH, A.P.
BRAGG, P.D. 1976 Anaerobic transport of amino acids coupled to the glycerol-3-phosphate-fumarate oxidoreductase system in a cytochrome-deficient mutant of Escherichia coli
Biochim. Biophys. Acta 423, 450 - 461

SMALLEY, A.J.
JAHRLING, P.
VANDEMARK, P.J. 1968 Molar growth yields as evidence for oxidative phosphorylation in Streptococcus faecalis strain 10 C 1
J. Bacteriol. 96, 1595 - 1600

SMITH, L. 1954a Bacterial cytochromes
Bacteriol. Rev. 18, 106 - 130

SMITH, L. 1954b Bacterial cytochromes. Difference spectra
Arch. Biochem. Biophys. 50, 299 - 314

SMITH, L.D.
HOBBS, G. 1974 Genus III, Clostridium Prazmowski 1880, 23
in: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (R.E. Buchanan und N.E. Gibbons, Hrsg.), The Williams & Wilkins Comp., Baltimore, 8. Aufl. S. 551 - 572

SONE, N. 1972 The redox reactions in propionic acid fermentation.
I. Occurrence and nature of an electron transfer system in Propionibacterium arabinosum
J. Biochem. 71, 931 - 940

SONE, N. 1974a Isolation of a novel menaquinone with a partly hydrogenated side chain from Propionibacterium arabinosum
J. Biochem. 76, 133 - 136

SONE, N. 1974b The redox reactions in propionic acid fermentation.
IV. Participation of menaquinone in the electron transfer system in Propionibacterium arabinosum
J. Biochem. 76, 137 - 145

SPENCER, M.E.
GUEST, J.R. 1973 Isolation and properties of fumarate reductase mutants of Escherichia coli
J. Bacteriol. 114, 563 - 570

SPENCER, M.E.
GUEST, J.R. 1974 Proteins of the inner membrane of Escherichia coli: changes in composition associated with anaerobic growth and fumarate reductase amber mutation
J. Bacteriol. 117, 954 - 959

SPERRY, J.F.
WILKINS, T.D. 1976 Cytochrome spectrum of an obligate anaerobe, Eubacterium lentum
J. Bacteriol. 125, 905 - 909

SPICHER, G. 1974 Cytochrome absorption spectra of bacteria as aid for solving taxonomic problems. I. Elaboration and description of a method for measuring the redox and carbon monoxide difference spectra of suspensions of intact live bacterial cells
Zbl. Bakt. II 226, 524 - 540

STADTMAN, T.C. 1959 A menadione-dependent enzymic hydrolysis of p-nitrophenyl phosphate
J. Biol. Chem. 234, 636 - 640

STADTMAN, T.C. 1966a Glycine reduction to acetate and ammonia: identification of ferredoxin and another low molecular weight acidic protein as components of the reductase system
Arch. Biochem. Biophys. 113, 9 - 19

STADTMAN, E.R. 1966b Some considerations of the energy metabolism in anaerobic bacteria in: Current Aspects of Biochemical Energetics (N.O. Kaplan und E.P. Kennedy, Hrsg.), Academic Press, New York, S. 39 - 61

STADTMAN, T.C.
ELLIOTT, P.
TIEMANN, L. 1958 Studies on the enzymic reduction of amino acids. III. Phosphate esterification coupled with glycine reduction
J. Biol. Chem. 231, 961 - 973

STICKLAND, L.H. 1951 The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction
J. Gen. Microbiol. 5, 698 - 703

STICKLAND, R.G. 1959a Some properties of the malic enzyme of pigeon liver. 1. Conversion of malate into pyruvate
Biochem. J. 73 , 646 - 654

STICKLAND, R.G. 1959b Some properties of the malic enzyme of pigeon liver. 2. Synthesis of malate from pyruvate
Biochem. J. 73, 654 - 659

STOPPANI, A.O.M.
FULLER, R.C.
CALVIN, M. 1955 Carbon dioxide fixation by Rhodopseudomonas capsulatus
J. Bacteriol. 69, 491 - 501

STOUTHAMER, A.H. 1969 Determination and significance of molar growth yields
in: Methods in Microbiology (J.R. Norris und D.W. Ribbons, Hrsg.), Academic Press, New York & London, Vol.1, S. 629 - 663

STOUTHAMER, A.H. 1973 A theoretical study on the amount of ATP required for synthesis of microbial cell material
Ant. v. Leeuwenhoek 39, 545 - 565

STOUTHAMER, A.H.
BETTENHAUSSEN, C. 1972 Influence of hydrogen acceptors on growth and energy production of Proteus mirabilis
Ant. v. Leeuwenhoek 38, 81 - 90

STOUTHAMER, A.H.
BETTENHAUSSEN, C.
1973 Utilization of energy for growth and maintenance in continuous and batch cultures of microorganisms. A re-evaluation of the method for the determination of ATP production by measuring molar growth yields
Biochim. Biophys. Acta 301, 53 - 70

STRAUSS, G.
NICKERSON, W.J.
1961 Photochemical cleavage of water by riboflavin. II. Role of activators
J. Amer. Chem. Soc. 83, 3187 - 3191

TAKEO, K.
MURAI, T.
NAGAI, J.
KATSUKO, H.
1967 Allosteric activation of DPN-linked malic enzyme from Escherichia coli by aspartate
Biochem. Biophys. Res. Commun. 29, 717 - 722

TAUSSKY, H.H.
SHORR, E.
1953 A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus
J. Biol. Chem. 202, 675 - 685

THAUER, R.K.
KIRCHNIAWY, F.H.
JUNGERMANN, K.A.
1972 Properties and function of the pyruvate-formate-lyase reaction in Clostridia
Eur. J. Biochem. 27, 282 - 290

TISDALE, H.
HAUBER, J.
PRAGER, G.
TURINI, P.
SINGER, T.P.
1968 Studies on succinate dehydrogenase. 15. Isolation, molecular properties, and isoenzymes of fumarate reductase
Eur. J. Biochem. 4, 472 - 477

TIWARI, N.P.
CAMPBELL, J.J.R.
1969 Utilization of dicarboxylic acids by Pseudomonas aeruginosa
Can. J. Microbiol. 15, 1095 - 1100

TOWLE, D.W.
COPENHAVER, J.H. Jr.
1970 Partial purification of a soluble $(Na^+ + K^+)$-dependent ATPase from rabbit kidney
Biochim. Biophys. Acta 203, 124 - 132

TRUDINGER, P.A.
1970 On the absorbancy of reduced methyl viologen
Anal. Biochem. 36, 222 - 224

UYEDA, K.
RABINOWITZ, J.C.
1971 Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase III. Purification and properties of the enzyme
J. Biol. Chem. 246, 3111 - 3119

VEEGER, C.
DER VARTANIAN, D.V.
ZEYLEMAKER, W.P.
1969 Succinate dehydrogenase
in: Methods in Enzymology (S.P. Colowick und N.O.Kaplan, Hrsg.), Academic Press, New York & London, Vol.XIII, S. 81 - 90

VERNON, L.P.
KAMEN, M.D.
1953 Studies on the metabolism of photosynthetic bacteria
XV. Photoautoxidation of ferrocytochrome c in extracts of Rhodospirillum rubrum
Arch. Biochem. Biophys. 44, 298 - 311

DE VRIES, W.
KAPTEYN, W.M.C.
VAN DER BEEK, E.G.
STOUTHAMER, A.H.
1970 Molar growth yields and fermentation balances of Lactobacillus casei L 3 in batch cultures and in continuous cultures
J. Gen. Microbiol. 63, 333 - 345

DE VRIES, W.
VAN WYCK-KAPTEYN, W.M.C.
OOSTERHUIS, S.K.H.
1974 The presence and function of cytochromes in Selenomonas ruminantium, Anaerovibrio lipolytica, and Veillonella alcalescens
J. Gen. Microbiol. 81, 69 - 78

DE VRIES, W.
VAN WYCK-KAPTEYN, W.M.C.
STOUTHAMER, A.H.
1972 Influence of oxygen on growth, cytochrome synthesis and fermentation pattern in propionic acid bacteria
J. Gen. Microbiol. 71, 515 - 524

DE VRIES, W.
VAN WYCK-KAPTEYN, W.M.C.
STOUTHAMER, A.H.
1973 Generation of ATP during cytochrome-linked anaerobic electron transport in propionic acid bacteria
J. Gen. Microbiol. 76, 31 - 41

WARBURG, O.
1926 Über die Wirkung des Kohlenoxyds auf den Stoffwechsel der Hefe
Biochem. Z. 177, 471 - 486

WARRINGA, M.G.P.J.
GIUDITTA, A.
1958 Studies on succinic dehydrogenase
IX. Characterization of the enzyme from Micrococcus lactilyticus
J. Biol. Chem. 230, 111 - 123

WARRINGA, M.G.P.J.
SMITH, O.H.
GIUDITTA, A.
SINGER, T.P.
1958 Studies on succinic dehydrogenase
VIII. Isolation of succinic dehydrogenase-fumaric reductase from an obligate anaerobe
J. Biol. Chem. 230, 97 - 109

WEBER, M.M.
BROADBENT, D.A. 1975 Electron transport in membranes from spores and from vegetative and mother cells of Bacillus subtilis
in: Spores VI. (P. Gerhardt, R.N. Costilow und H.L. Sadoff, Hrsg.), American Society for Microbiology, S. 411 - 417

WEBER, M.M.
MATSCHEINER, J.T.
PECK, H.D. 1970 Menaquinone-6 in the strict anaerobes Desulfovibrio vulgaris and Desulfovibrio gigas
Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 197 - 204

WEIBULL, C. 1956 Bacterial protoplasts: their formation and characteristics
in: Bacterial Anatomy, 6th Symposium of the Society for General Microbiology, University Press, Cambridge, S. 111 - 126

WEIBULL, C.
GREENAWALT, J.W.
LÖW,H. 1962 The hydrolysis of adenosine triphosphate by cell fractions of Bacillus megaterium. I. Localization and general characteristics of the enzyme activities
J. Biol. Chem. 237, 847 - 852

WEST, I.C. 1974 The membrane adenosine triphosphatase of bacteria
Biochem. Soc. Spec. Publ. 4, 27 - 38

WHITE, D.C. 1966 The obligatory involvement of the electron transport system in the catabolic metabolism of Haemophilus parainfluenzae
Ant. v. Leeuwenhoek 32, 139 - 158

WHITE, D.C.
BRYANT, M.P.
CALDWELL, D.R. 1962 Cytochrome-linked fermentation in Bacteroides ruminicola
J. Bacteriol. 84, 822 - 828

WHITE, D.C.
SINCLAIR, P.R. 1971 Branched electron-transport systems in bacteria
Adv. Microbial Physiol. 5, 173 - 211

WIERINGA, K.T. 1936 Over het verdwijnen van waterstof en koolzuur onder anaerobe voorwaarden
Ant. v. Leeuwenhoek 3, 263 - 273

WIERINGA, K.T. 1940 The formation of acetic acid from carbon dioxide and hydrogen by anaerobic spore-forming bacteria
Ant. v. Leeuwenhoek 6, 251 - 262

WILLECKE, K.
LANGE, R. 1974 $C_4$-dicarboxylate transport in Bacillus subtilis studied with 3-fluoro-L-erythro-malate as a substrate
J. Bacteriol. 117, 373 - 378

WILSON, M.A.
CASCARANO, J. 1970 The energy-yielding oxidation of NADH by fumarate in submitochondrial particles of rat tissues
Biochim. Biophys. Acta 216, 54 - 62

WOLIN, M.J.
WOLIN, E.A.
JACOBS, N.J. 1961 Cytochrome-producing anaerobic vibrio, Vibrio suçcinogenes, sp. n.
J. Bacteriol. 81, 911 - 917

WOOD, H.G.
UTTER, M.F. 1965 The role of $CO_2$ fixation in metabolism
in: Essays in Biochemistry (P.N. Campbell und G.D. Greville, Hrsg.), Academic Press, New York & London, Vol.1, S. 1 - 27

WOODS, D.D.
CLIFTON, C.E. 1937 Hydrogen production and amino acid utilization by Clostridium tetanomorphum
Biochem. J. 31, 1774 - 1788

YAGI, T. 1969 Formate:cytochrome oxidoreductase of Desulfovibrio vulgaris
J. Biochem. 66, 473 - 478

YAMAGUCHI, M.
TOKUSHIGE, M.
TAKEO, K.
KATSUKI, H. 1974 Studies on the regulatory functions of malic enzymes. III. Regulatory effects of L-aspartate, coenzyme A, and divalent metal ions on NAD-linked malic enzyme from Escherichia coli
J. Biochem. 76, 1259 - 1268

YOSHIDA, A. 1969 L-malate dehydrogenase from Bacillus subtilis
in: Methods in Enzymology (S.P. Colowick und N.O. Kaplan, Hrsg.), Academic Press, New York & London, Vol.XIII, S. 141 - 145

YOSHIZUMI, F.K.
COLEMAN, J.E. 1974 Metalloalkaline phosphatases from Bacillus subtilis: physicochemical and enzymatic properties
Arch. Biochem. Biophys. 160, 255 - 268

ZINK, M.W. 1972 Regulation of the two "malic" enzymes in Neurospora crassa
Can. J. Microbiol. 18, 611 - 617

ZINK, M.W. 1974 Mechanism of regulation of the malic enzyme from Fusarium
Can. J. Microbiol. 20, 443 - 454

ZINK, M.W.
KATZ, J.S. 1973 Malic enzyme of Fusarium oxysporum
Can. J. Microbiol. 19, 1187 - 1196

Herrn Prof. Dr. G. Gottschalk möchte ich für die Anregung zu dieser Arbeit und die mir stets gewährte Unterstützung danken.

Herrn Dr. J.R. Andreesen danke ich für sein lebhaftes Interesse am Fortgang der Arbeit sowie anregende und hilfreiche Diskussionen.

Frl. Dr. I. Probst möchte ich für die Anleitung zur Aufnahme von Differenzspektren und hilfreiche Ratschläge danken.

Weiterhin sei mein Dank Herrn Dr. A. Kröger für Anleitungen und Ratschläge zur Menachinonextraktion und Frau A. Walther-Mauruschat für die Anfertigung von Dünnschnitten ausgesprochen.

LEBENSLAUF

Am 27. Juli 1949 wurde ich, Mechthild Dorn, geb. Gottwald, als Tochter des Diplom-Chemikers Eberhard Gottwald und seiner Ehefrau Ingeborg, geb. Grünewald, in Jena/Thür. geboren. Von 1956 bis 1960 besuchte ich die Egelsbergschule in Göttingen und wechselte 1960 zum Neuen Gymnasium in Göttingen über, wo ich im Sommer 1968 die Reifeprüfung ablegte. Vom Wintersemester 1968/69 bis zum Wintersemester 1970/71 studierte ich an der Georg-August-Universität Göttingen Mikrobiologie. Im Sommersemester 1971 setzte ich mein Studium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen fort. Zum Wintersemester 1971/72 kehrte ich nach Göttingen zurück und legte im Oktober 1972 die Diplom-Hauptprüfung für Biologie in den Fächern Mikrobiologie, Chemie und Physiologische Chemie ab. Die anschließend im Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen angefertigte Diplomarbeit trug den Titel: "Untersuchungen zum Pentosestoffwechsel bei Homoacetatgärern". Seit September 1973 arbeite ich an der vorliegenden Dissertation.